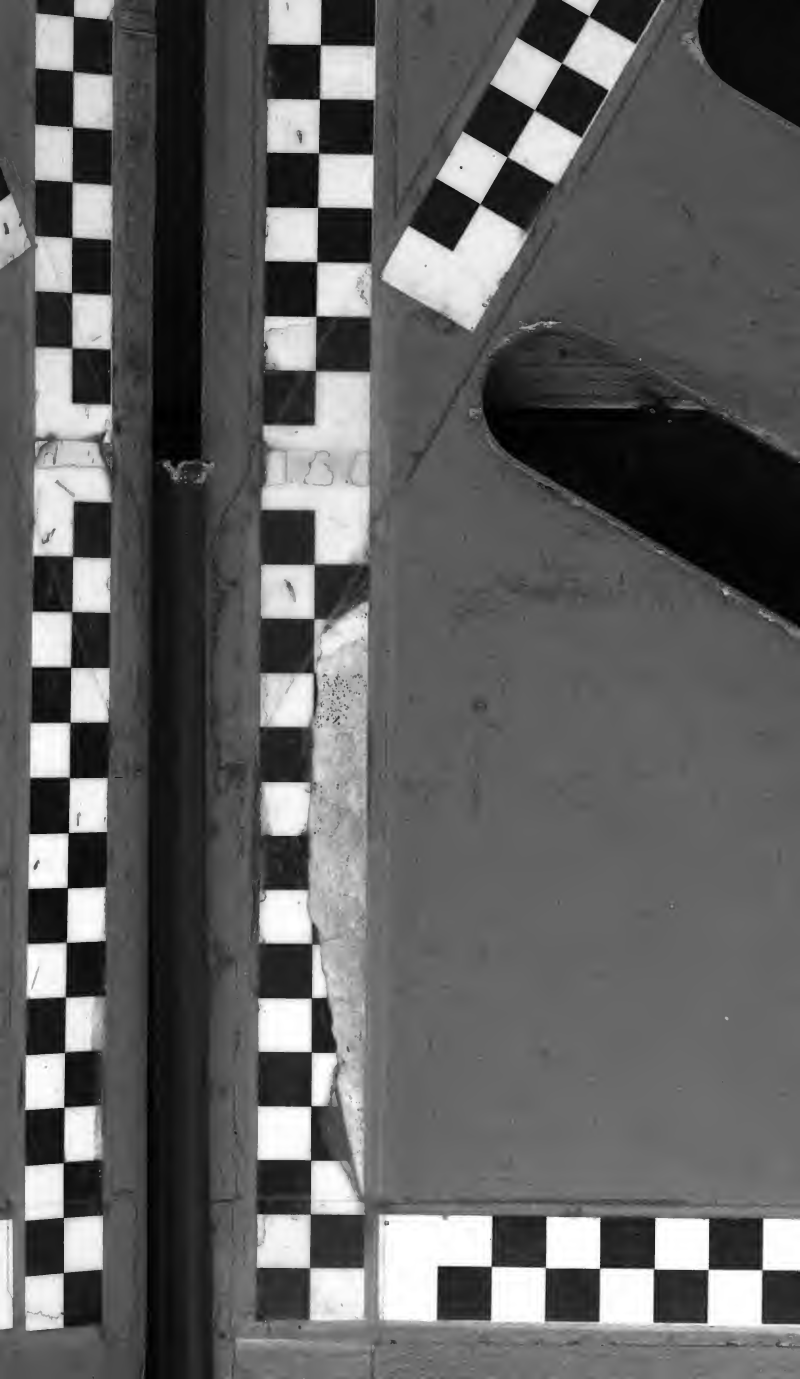
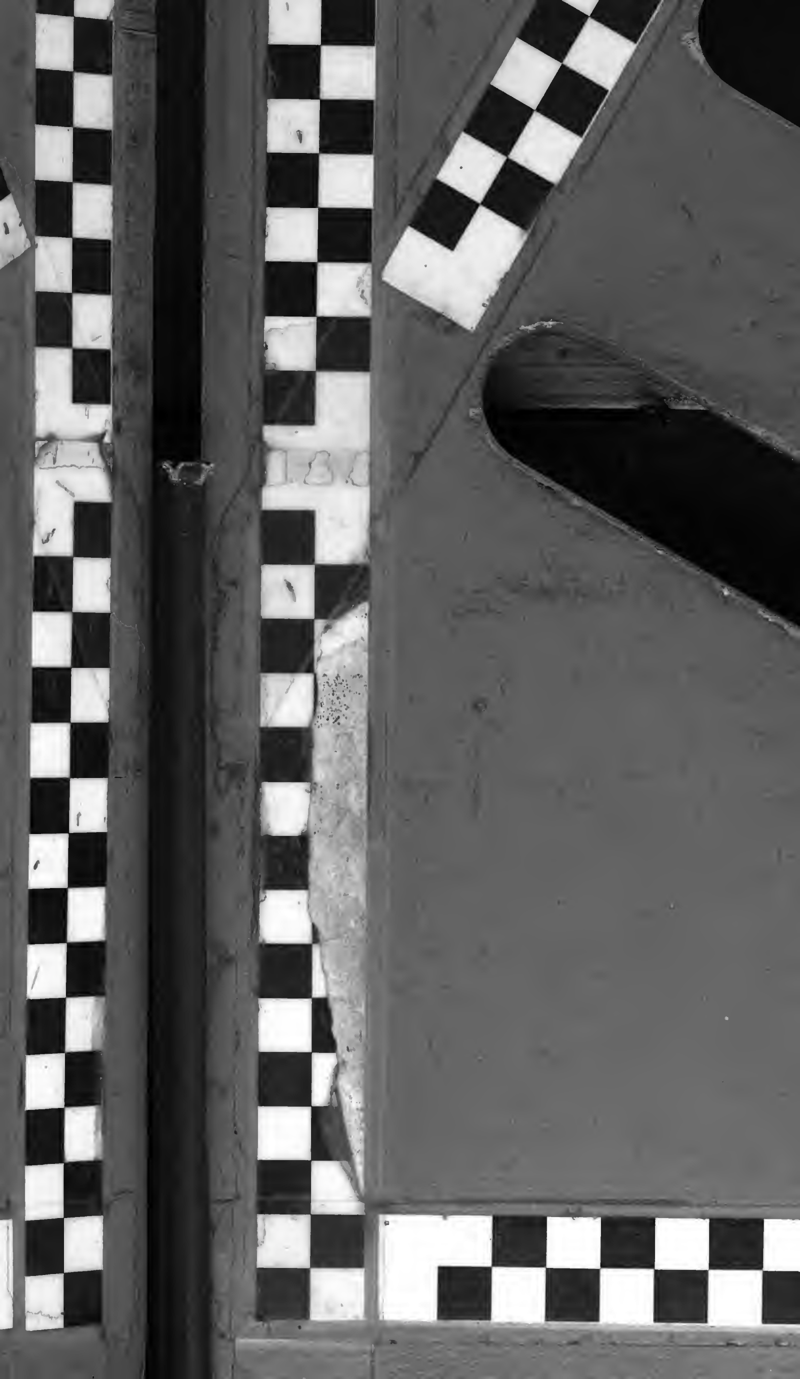
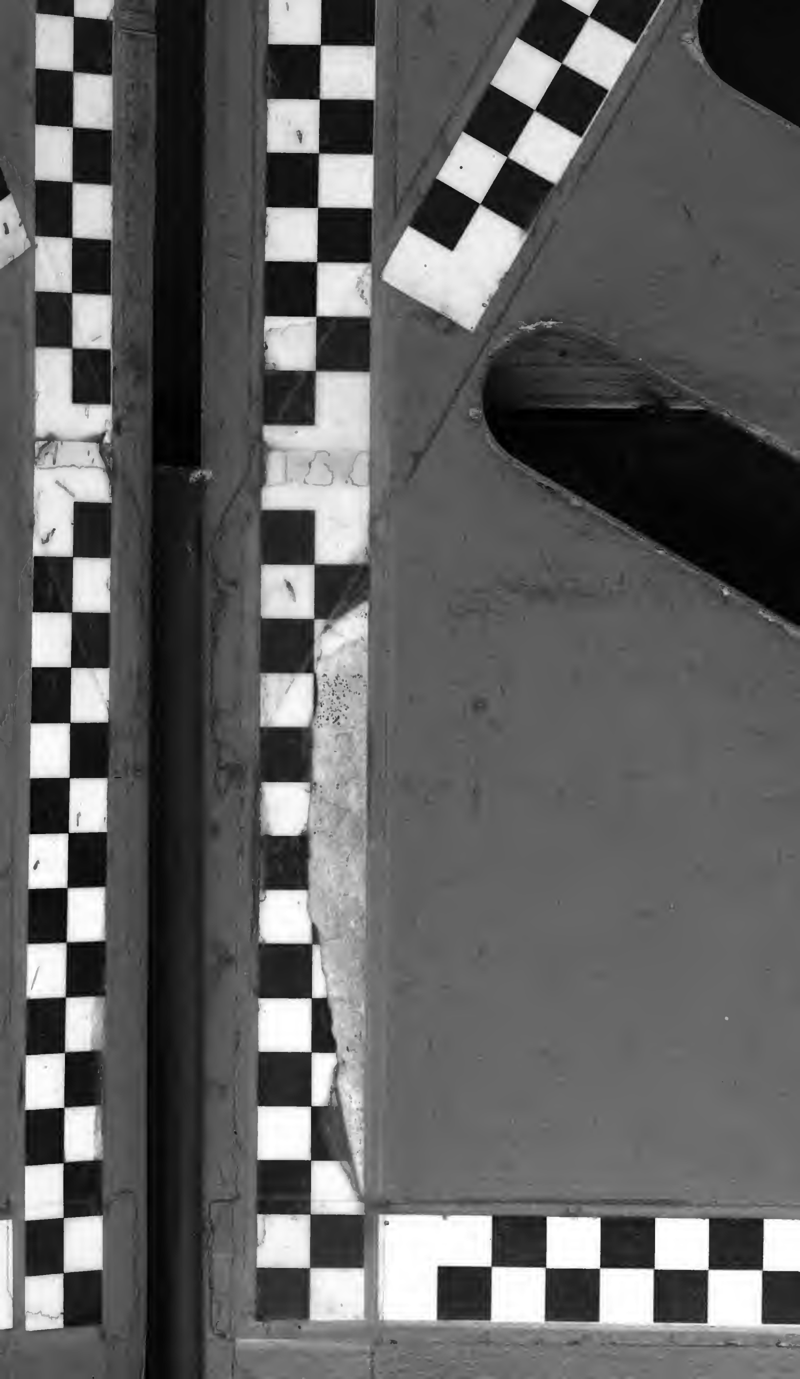


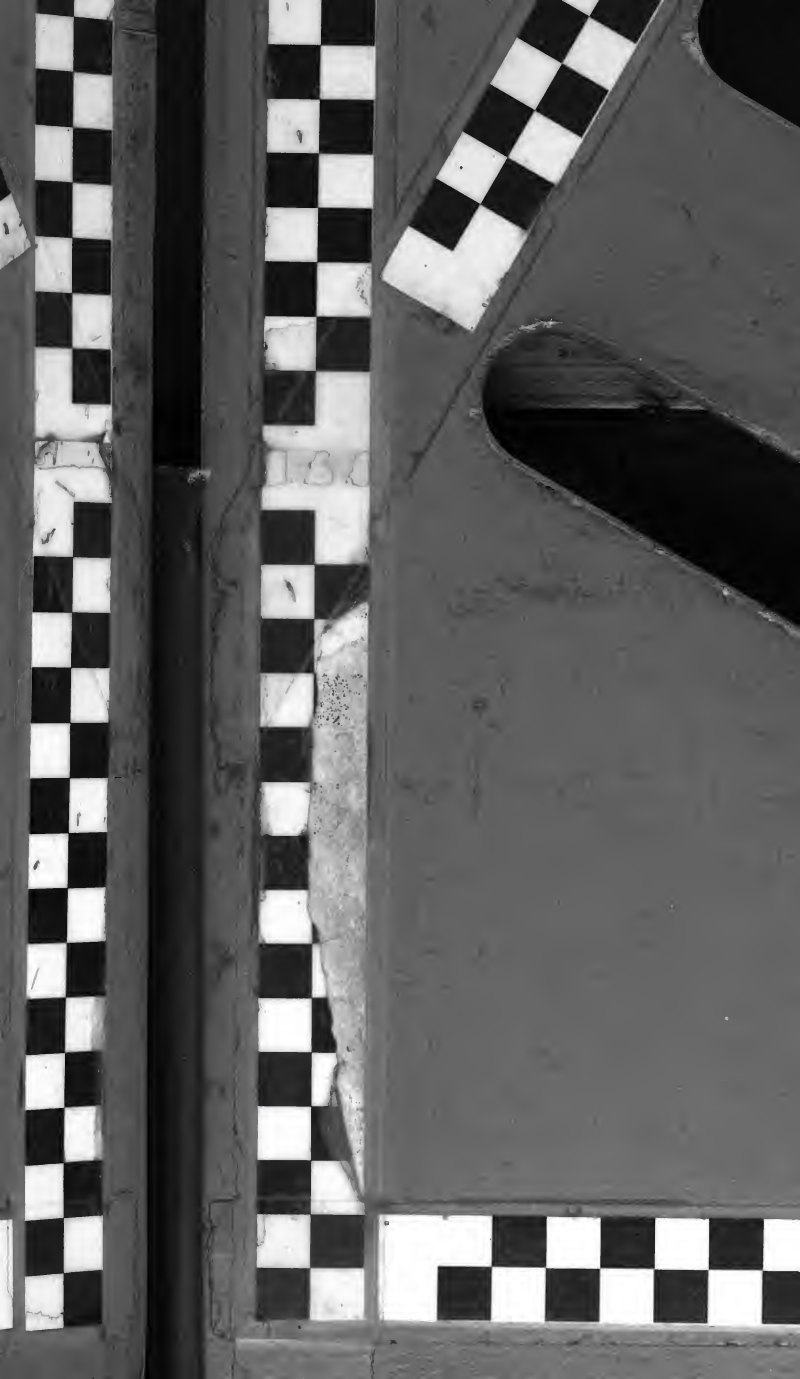








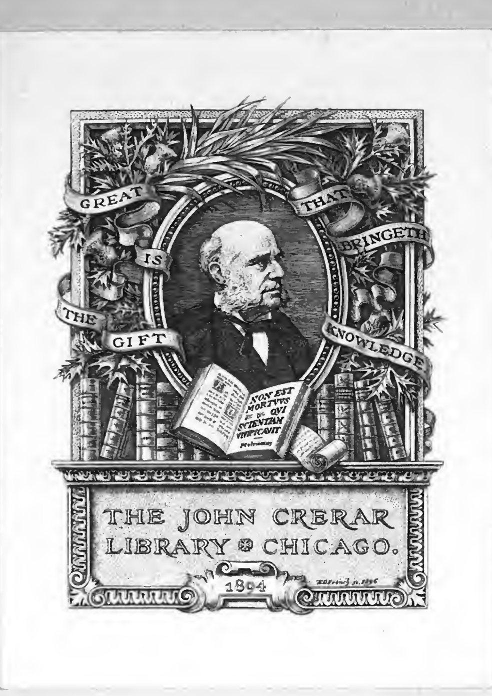











GREAT
IS
THE
GIFT
THAT
BRINGETH
KNOWLEDGE
NON EST MORTVVS QVI SCIENTIAM VIVIFICAVIT
THE JOHN CRERAR LIBRARY CHICAGO.
1894

UEBER

KERN- UND SPORENBILDUNG

BEI BACTERIEN.

HABILITATIONSSCHRIFT

ZUR

ERLANGUNG DER VENIA DOCENDI

AN DER

RUPRECHT-CARLS-UNIVERSITÄT

DER

HOHEN MEDICINISCHEN FACULTÄT ZU HEIDELBERG

VORGELEGT

VON

DR. PAUL ERNST,

I. ASSISTENTEN DES PATHOLOGISCHEN INSTITUTES.

MIT ZWEI TAFELN.

LEIPZIG,

VEIT & COMP.

1888.

Abgedruckt aus

Zeitschrift für Hygiene.

Fünfter Band.

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig.

Es ist mir unlängst vergönnt gewesen, gelegentlich einer Untersuchung über den Xerosisbacillus[1] auf eine neue Methode[2] aufmerksam zu machen, die an Leistungsfähigkeit die bisher übliche, von Buchner inaugurirte, von Neisser und Hüppe ausgebildete Farbenreaction zum Nachweis endogener Sporen zu überbieten schien. Zur Stütze meiner Ansicht, es seien die blauen, kugeligen Dinge in den braunen Xerosisstäbchen Sporen oder wenigstens Analoga solcher, habe ich mir damals genügen lassen, eine Serie von Mikroorganismen namhaft zu machen, die in exactester Weise mit unzweideutigen Bildern auf meine Reaction antworten. Ich habe mit Betonung namentlich auf den Bacillus der blauen Milch hingewiesen, weil in den gebräuchlichen Compendien eine Sporenbildung dieser Species als bekannt vorausgesetzt und in Neelsen's Originalarbeit[3] eine solche schon sichergestellt ist. Es war mir darin also ein Anhaltepunkt, ein sicheres Vergleichsobject in die Hand gegeben. Sodann durfte ich die Reaction auch auf gewisse Kokken ausdehnen, von denen ich damals nur einen zufällig eingeschlichenen Anonymus erwähnte, ein Fund, den Neisser seither[4] mit wohlwollender Anerkennung

---

[1] Ueber den Bacillus xerosis und seine Sporenbildung. *Zeitschrift für Hygiene.* Bd. IV. Heft 1.

[2] Das mit starker alkalischer Löffler'scher Methylenblaulösung beträufelte Deckglas wird über der Flamme hin- und herbewegt bis leichte Dämpfe aufsteigen — die Lösung darf nicht in's Sieden kommen —, dann in Wasser abgespült und in wässriger Bismarckbraunlösung nachgefärbt.

[3] Studien über blaue Milch. Cohn's *Beiträge.* Bd. III. S. 187.

[4] Versuche über die Sporenbildung u. s. w. *Zeitschrift für Hygiene.* Bd. IV. Hft. 2. S. 192.

Abgedruckt aus

Zeitschrift für Hygiene.

Fünfter Band.

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig.

Es ist mir unlängst vergönnt gewesen, gelegentlich einer Untersuchung über den Xerosisbacillus[1] auf eine neue Methode[2] aufmerksam zu machen, die an Leistungsfähigkeit die bisher übliche, von Buchner inaugurirte, von Neisser und Hüppe ausgebildete Farbenreaction zum Nachweis endogener Sporen zu überbieten schien. Zur Stütze meiner Ansicht, es seien die blauen, kugeligen Dinge in den braunen Xerosisstäbchen Sporen oder wenigstens Analoga solcher, habe ich mir damals genügen lassen, eine Serie von Mikroorganismen namhaft zu machen, die in exactester Weise mit unzweideutigen Bildern auf meine Reaction antworten. Ich habe mit Betonung namentlich auf den Bacillus der blauen Milch hingewiesen, weil in den gebräuchlichen Compendien eine Sporenbildung dieser Species als bekannt vorausgesetzt und in Neelsen's Originalarbeit[3] eine solche schon sichergestellt ist. Es war mir darin also ein Anhaltepunkt, ein sicheres Vergleichsobject in die Hand gegeben. Sodann durfte ich die Reaction auch auf gewisse Kokken ausdehnen, von denen ich damals nur einen zufällig eingeschlichenen Anonymus erwähnte, ein Fund, den Neisser seither[4] mit wohlwollender Anerkennung

[1] Ueber den Bacillus xerosis und seine Sporenbildung. *Zeitschrift für Hygiene.* Bd. IV. Heft 1.

[2] Das mit starker alkalischer Löffler'scher Methylenblaulösung beträufelte Deckglas wird über der Flamme hin- und herbewegt bis leichte Dämpfe aufsteigen — die Lösung darf nicht in's Sieden kommen —, dann in Wasser abgespült und in wässriger Bismarckbraunlösung nachgefärbt.

[3] Studien über blaue Milch. Cohn's *Beiträge.* Bd. III. S. 187.

[4] Versuche über die Sporenbildung u. s. w. *Zeitschrift für Hygiene.* Bd. IV. Hft. 2. S. 192.

als den ersten Nachweis sporenähnlicher Dinge, man kann allgemein sagen, histologischer Details in Coccaceen begrüsst hat. Ich kann nun heute die provisorische Notiz durch sichere Daten ersetzen und bekannt geben, dass beide Staphylokokken, der weisse und goldgelbe, die Reaction in schönster Weise geben. Die Fig. 7 der früheren Arbeit[1] passt so ganz und gar auch für diese neueren Präparate, dass ich einer neuen Zeichnung entrathen kann, umsomehr, als ich nicht vorhabe, in dieser Arbeit tiefer auf die Sporenfrage der Mikrokokken mich einzulassen, sondern darüber wieder eine besondere Versuchsreihe unternehmen möchte, über die ich später zu berichten gedenke, wenn alsdann das Bedürfniss nach Aufklärung in dieser Frage noch besteht. Immerhin sei jetzt schon erwähnt, dass bis heute kein Streptococcus, weder der des Erysipels, noch der Pyogenes sich der Reaction gewogen gezeigt haben. Es scheint mir nicht uninteressant, wenn es sich bewahrheiten sollte, dass Traubenkokken und Kettenkokken verschiedenen Fortpflanzungsmodi folgen. Doch, wie gesagt, ein abschliessendes Urtheil behalte ich mir vor.

Auch bezüglich der Sarcinen haben sich meine Erfahrungen vermehrt und erweitert. Ich habe seither an deren mehreren dieselben Bilder wieder getroffen, von denen ich eine auf der früheren Tafel wiedergegeben habe. Eine gelbe Sarcine, die in späterem Verlaufe die Gelatine verflüssigt und die ich im Conjunctivalsack bei Frühjahrskatarrh fand, ohne dass ich behaupten wollte, dass dies ein anderer als zufälliger Befund gewesen sei, gab die Reaction prompt und schön. Mit den Hauser'schen Errungenschaften zusammen sind das doch wieder Bereicherungen unserer Kenntnisse. Ein weiteres Eingehen auf diese Frage musste ich mir versagen.

Kam es mir nun das letzte Mal nur darauf an, Rechenschaft darüber abzulegen, was mich über die Biologie des Bacillus Xerosis die neue Reaction gelehrt hatte, waren also jene Nebenfunde über Kokken, Sarcinen und Bacillus cyanogenus bei der Beschränkung des Themas gewissermassen nur episodisch eingeschaltet, so will ich heute meinem Versprechen nachkommen, den Werth und die Bedeutung der Reaction allseitig in grösserem Rahmen zu prüfen, und mittheilen, was ich seither mit Hülfe der angegebenen Methode erfahren habe. Ein Blick auf jenes spärliche Material hatte mir schon die Ueberzeugung aufgedrängt, dass die Anwendung der Reaction in ausgedehntem Maassstabe eine reichere Ausbeute verspreche, mit anderen Worten, dass man aus vielen Einzelbefunden Allgemeines und Gesetzmässiges über die Sporulation zu abstrahiren hoffen dürfte. Dass es lohnend ist, sich mit der Erforschung der Sporulation

[1] A. a. O.

abzugeben, daran wird Niemand zweifeln; Alle, die von der Bacteriologie Nutzen ziehen, Hygieniker, Chirurgen und Pathologen, haben das allerregste Interesse an der Förderung der Fortpflanzungslehre im Gebiete der Mikroorganismen. Zum Ueberfluss kann ich es mir nicht versagen, noch eigens dies Bedürfniss zahlenmässig zu illustriren. Ein Gang durch die zweite Auflage der Eisenberg'schen Tabellen lehrt, dass, abgesehen von den Hyphomyceten, 118 Mikroorganismen namhaft gemacht sind. Bei 36 Exemplaren finden wir nun positive Angaben in der Rubrik „Sporenbildung". Aber unter diesen positiven Notizen figuriren viel umstrittene, noch keineswegs sicher gestellte Dinge, wie Sporen der Cholera-, Typhus-, Syphilisbacillen u. s. w. Bei 13 Exemplaren finden wir negative Bemerkungen und bei 69 angeführten Species ist die Rubrik leer, führt nichts als die Ueberschrift. Wen sollte es da nicht reizen, das neue Werkzeug, das ein günstiges Geschick ihm in die Hände spielt, zu nützen und damit zu bohren, wenn es auch vielleicht nur ein Schacht wird, von dem aus nun nach verschiedensten Seiten der Abbau beginnen mag.

Angesichts des ansehnlichen Materials — und wie es bei solchen Untersuchungen zu gehen pflegt, lange nicht alles Untersuchte ist in dem Protocoll wirklich niedergelegt — nöthigt uns schliesslich die Wahrnehmung zur Bescheidenheit, dass bei einer verschwindend kleinen Zahl von Species es gelungen ist, den Formenkreis ganz lückenlos zu demonstriren. Doch hat sich denn bald durch unausgesetztes Vergleichen gezeigt, dass da in eine Bresche der Beweisführung wenigstens die Analogie einer anderen Species stützend eintritt, dass dort postulirte, aber immer und immer wieder vermisste Zwischenstufen und Uebergangsformen von anderen, vielleicht nahe stehenden Species gewissermaassen geliehen werden. Was an einem Exemplar auch durch fortdauerndes Studium nicht erreicht worden wäre, das hat sich durch stete vergleichende Beobachtung allmählich und fast unvermerkt eingestellt. So haben sich mir doch ziemlich bestimmte und abgerundete Vorstellungen über die protoplasmatischen Vorgänge innerhalb des Bacillenleibes aufgedrängt. Aber trotz des sorgfältigsten Studiums alles Thatsächlichen und trotz oftmaliger Wiederholung und Prüfung alles Experimentellen, worüber in den folgenden Blättern berichtet werden soll, bilde ich mir durchaus nicht ein, dass, was Auslegung und Auffassung des Geschilderten anbetrifft, das letzte Wort hiermit gesprochen sein werde. Es giebt Untersuchungen, deren Abschluss einen gewissen Muth erheischt und das Versprechen voraussetzt, späterhin da und dort ausbessern zu wollen nach Maassgabe fortschreitender Selbstbelehrung.

Nach der ersten Zeit des planlosen Herumtastens gerieth ich auf den Bacillus fluorescens putidus, der mir denn auch günstiges Material bot

für den ersten systematisch und rationell unternommenen Versuch. An diesem zunächst sind meine Ansichten und Auffassungen gereift, an diesem möchte ich auch alles Gewonnene erläutern auf die Gefahr hin, zwar zu breit zu werden und weitschweifig zu erscheinen, in der Hoffnung aber, mich nachher um so kürzer fassen zu dürfen, da oft ein Hinweis auf den Haupttypus genügen wird.

Seine weitgehende Aehnlichkeit mit dem Bacillus cyanogenus im culturellen Verhalten hat mich zuerst auf ihn aufmerksam gemacht. Es ist mir anfänglich entgangen, dass dies Hüppe schon aufgefallen ist, der ihn zum Vergleich mit dem Bacillus der blauen Milch oft und gerne herbeigezogen hat.

In (Fig. 1, Taf. V) gebe ich das Bild einer 6 tägigen Gelatinecultur wieder. Es sind kurze, eher etwas plumpe Bacillen, deren Länge im Allgemeinen die Dicke um das zwei- bis dreifache übertrifft. Die Enden sind leicht conisch verdünnt und abgerundet. Eine Gruppirung zu Zweien wird selten angetroffen. Hie und da begegnet man wohl längeren und schlanken Stäbchenformen, ja langen Fäden sogar, die das zehnfache Ausmaass der kurzen besitzen. Alle erwähnten Formen färben sich mit Bismarckbraun hübsch homogen, ohne in ihrem Innern Unregelmässigkeiten, Gliederungen oder Differenzirungen des Protoplasmas zu zeigen. Vor Allem aber vermissen wir jede Andeutung blauer Kügelchen durchaus. Es ist kein anderes Bild, als wenn es von vornherein einzig und allein mit Bismarckbraun gefärbt worden wäre. Zudem handelt es sich durchweg um wohlausgebildete bacilläre Typen; nichts von regressiver Metamorphose; nichts von Involution.

Schon etwas anders wächst unser Bacillus auf der Kartoffel (Fig. 2, Taf. V). Hat die Cultur nur wenige Tage bei Zimmertemperatur gestanden, so unterscheiden sich die einzelnen Bacillen durch etwas beträchtlichere Grössen schon von Fig. 1. Ihre Dicke ist viel wechselnder. Die langen Fadengebilde übertreffen die der Fig. 1 bei weitem. Ferner ist eine gewisse Anzahl etwas unregelmässig contourirter Einzelstäbchen im Gesichtsfeld zerstreut, die einen leise grünlich-blauen Farbenton angenommen, bez. trotz Bismarckbraun festgehalten haben. Hin und wieder, doch nichts weniger als häufig, trägt ein solches in seinem kolbenförmig angeschwollenen Ende ein blaues Kügelchen. Verhältnissmässig recht viele Stäbchen — es ist natürlich schwer, eine auch nur approximative Schätzung zu geben, aber es dürfte ungefähr der sechste oder achte Theil sein — tragen bald in der Mitte, bald an einem, selten an beiden Enden ein feines blaues Kügelchen. Ihrer mehrere liegen eigentlich nur in längeren Stäbchen und Fäden, doch in letzteren stellenweise bis zu sechs an Zahl. Späteren Beobachtungen gegenüber muss betont werden, dass alle Kügelchen genau

dasselbe Caliber haben und dass sie nirgends über den Seitencontour des Stäbchens hinausragen oder durch ihre Grösse das Stäbchen an der Einbettungsstelle zu Anschwellungen nöthigen. Ja, es gelingt stets bei scharfer Einstellung nachzuweisen, dass die Kügelchen in die braunen Stäbchen eingebettet sind, dass eine feine Bacillenhülle die Kügelchen beiderseits flankirt.[1] Mit Hartnack's Zeichenapparat und homogener Immersion Zeiss $^1/_{16}$ gemessen und gezeichnet, stellen sich die Grössenunterschiede gegenüber Fig. 1 so dar, dass die Einzelstäbchen drei bis vier Mal so lang sind wie dort. Die Breite mag etwa die doppelte sein.

Wird nun aber eine Kartoffelcultur von dem Alter einiger Tage 24 Stunden in den Brütschrank gestellt, so ändert sich das Bild urplötzlich (Fig. 3). Vor Allem sind die Bacillen zu ganz enormen Dimensionen angewachsen. Drei bis vier Mal so dick, sind sie auch drei bis vier Mal so lang geworden; daneben sind aber schlangenähnliche Figuren von zehnfacher Länge keine Seltenheit. Sodann trennen sich die Bacillen in zwei völlig differente Lager. Da sind einmal $^2/_3$ der Gesammtheit (grob abgeschätzt —) durch geringere Tingibilität und Dimensionen kenntlich, und erinnern in allen Dingen an die Exemplare der Fig. 2; doch hat diesen gegenüber die Dimension um etwas zugenommen, die Schärfe der Contouren gelitten. Es sind sehr viel blasse, wenig scharf begrenzte, angenagte und zerfallende Wesen dabei, so dass es hier und da zu einer wenig differenzirten diffus gelblich gefärbten Masse kommt, aus der sich dann allerdings das übrige $^1/_3$ der Bacillen scharf genug abhebt. Diese letzteren sind es nun, welche jene schon erwähnten ungeheuren Schlangenfiguren aufweisen und sich ziemlich intensiv braun färben; sie sind es auch, die die blauschwarzen Kügelchen ausschliesslich in Pacht genommen zu haben scheinen. Nicht durchweg zwar. Da und dort liegt auch ein kleineres blasses Stäbchen mit centralem oder endständigem schwarzen Knöpfchen, doch sind diese letzteren dieselben kleinen schwarzen Pünktchen der Fig. 2 und können sich in keiner Weise messen mit den Dingen, von denen nun die Rede sein soll. Es sind dies dunkle, scharf umschriebene, blauschwarze Kügelchen, Körner und Tropfen, die häufig endständig in den kolbigen Endanschwellungen der grossen gewundenen Bacillen liegen, da und dort in Reihen von drei, vier und fünf Exemplaren mitten im Bacillus gruppirt, da und dort zu zweien zu einem tropfenähnlichen Gebilde verschmolzen, auch in birnförmigen Dingen vertreten. In dieser Phase der Entwickelung nun werden die Kügelchen selten so gross, dass nicht noch die braungefärbte Bacillenhülle rings um das Kügelchen herum sich verfolgen liesse. Endständige Körner höchstens sitzen gleichsam als

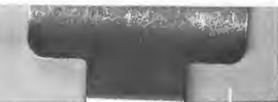
[1] Vgl. Aehnliches in der Mittheilung über Xerosisbacillen. A. a. O.



selbständige Dinge den Bacillen auf, wie ein Stecknadelkopf der Nadel. Die Kügelchen haben in diesem Bild die allermannigfaltigsten Formen und Grössen, so verschieden, dass man an eine ganz heterogene Provenienz und Bedeutung der schwarzblauen Substanz zu glauben versucht sein könnte. Der Zweifel an ihrer Eindeutigkeit wird aber dadurch noch verstärkt, dass manche etwas dickeren Bacillen von schwarzem Staub wie gepudert aussehen, einige sogar so dicht, dass die braune Matrix ganz davon verdrängt ist. So verschieden nun und so klein diese Stäubchen sein mögen, niemals haben sie Splitter- oder sonstwie unregelmässige Formen, immer sind sie fast kugelig, zum Mindesten rund. Es macht diese Erscheinung den Eindruck, dass in der Grundsubstanz des Bacillus sich in feinstvertheiltem Zustande eine neue Substanz ausscheide, Emulsionströpfchen vergleichbar, die vielleicht zu grösseren Tröpfchen confluiren und so zu den späteren Bildern führen, oder von denen einige auf Kosten der anderen weiter gedeihen und anwachsen und bei zunehmender Grösse die anderen verdrängen, erdrücken. Nach welchem von diesen beiden denkbaren Modi aus den dichtbestäubten Formen die Stäbchen mit den wenigen grossen Kügelchen werden, das ist nach blosser morphologischer Betrachtung kaum jemals sicher zu entscheiden, und den Vorgang in vivo zu betrachten ist deswegen unthunlich, weil man alsdann auf die Farbenreaction verzichten müsste, auf ein Mittel, das uns ja einzig die Einsicht in diese kleinen Verhältnisse erschlossen hat.

Namentlich im Hinblick auf die späteren Entwickelungsstufen muss ein Ding noch erwähnt werden; zahlreiche und relativ gut ausgeprägte und wohlerhaltene Bacillen enthalten helle rundliche Lücken von verschiedenen Grössen, die aber nach der ganzen Art der Lichtbrechung den Eindruck wirklicher Lücken, hohler Vacuolen machen und durchaus nicht denjenigen eines positiven Etwas, das nur den Farbstoff verschmäht. Zum kleineren Theile finden sich diese Vacuolen (s. v. v.) mit blauen Kügelchen zusammen in einem und demselben Bacillus, dann aber höchstens ein bis zwei an Zahl. Meist aber occupiren sie allein für sich den Bacillus, aber nie in dicht stehenden Reihen, wie die blauen Kügelchen, in Rosenkranzform, sondern immer in mässigen Abständen, in längeren Bacillen auch nur zu dritt oder viert.

Fig. 4 ist einer Cultur entnommen, die zwei Mal 24 Stunden im Brütschranke verweilt hatte. Die Dimensionen der Bacillen sind noch viel beträchtlicher geworden. Formen von doppelter Länge und Breite als wie in Fig. 3 sind keine Seltenheit. Es gründet sich diese Angabe wiederum nicht auf eine approximative Schätzung, die bekanntlich in mikroskopischen Dingen sehr irreführen kann, sondern auf Mikrometermessungen und Zeichnungen mittels des Apparates. Wellige, schlangenähnliche Krümmungen



haben eher noch zugenommen. Das Caliber der Körner hat mit dem der einbettenden Bacillen gleichen Schritt gehalten, ja dieselben noch überflügelt. Nicht nur, dass die Körner, wie in Fig. 3, die ganze Breite des Bacillus einnehmen, so dass im Gegensatz zu Fig. 2 die flankirenden braunen Dämme schwinden, sondern die Körner überragen jetzt den Contour des Bacillus, bilden förmliche Buckel am Umriss. Ein deutliches Bestreben der Bacillen, die Grössenunterschiede auszugleichen, ist nicht zu verkennen. Dementsprechend sind jene in Fig. 3 geschilderten bestäubten Formen so gut wie ganz verschwunden und nur spärliche Abkömmlinge jener Dinge, Bacillen mit mehreren kleineren, unregelmässigen und noch nicht in Reihen geordneter Kügelchen liegen da und dort im Gesichtsfeld. Die Mehrzahl der Bacillen begnügt sich mit ein bis vier Kügelchen, ja es scheint ein gewisses Gesetz zu walten, dass mit zunehmender Grösse der Körner ihre Menge abnimmt.

Ein vergleichender Blick auf Fig. 4 und 3 belehrt aber noch über einen weiteren, nicht unwichtigen Unterschied. Eine merkwürdige Veränderung hat die weitaus überwiegende Mehrzahl der Bacillen ergriffen und zwar ausschliesslich das grosse Contingent jener, die nicht mit Kügelchen armirt sind. Die homogene Beschaffenheit der Bacillen, die sich in einer gleichmässigen Tinction ausspricht, ist verloren gegangen. Jeder Bacillus ist durchsetzt von weissen Lücken von ovaler oder runder Configuration. In Fig. 3 schon sind uns deren einige aufgefallen. Nun aber haben sie die Oberhand. Die Gründe, die mich bestimmen, die hellen Wesen als Vacuolen anzusprechen, sind oben auseinandergesetzt. Kein in mikroskopischen Dingen Bewanderter, dem ich die Bilder vorlegen durfte, hat diese Dinge für etwas anderes als eben Vacuolen gehalten. Es hat nun ein gewisses Interesse, einer etwaigen Gesetzmässigkeit in Zahl und Anordnung und gegenseitigem Verhalten von Kügelchen und Vacuolen nachzuspüren. Und in der That zeigt sich darin eine Constanz. Mit nahezu verschwindenden Ausnahmen, die übrigens Fig. 4 auch berücksichtigt, schliessen sich Kügelchen und Vacuolen gegenseitig aus. Birgt ein Bacillus Kügelchen in sich, so ist er gegen Vacuolen gefeit, ist er von Vacuolen occupirt, so scheinen sich hinwiederum die Kügelchen nicht entwickeln zu können. Als gehemmte Entwickelung muss in der That das Fehlen der Körner ausgelegt werden, denn wo auch immer sie ausnahmsweise neben Vacuolen vorkommen, bleiben sie an Zahl und Grösse unverkennbar hinter den anderen zurück.

Stellt die Fig. 5 nun dieselbe Cultur nach dreitägigem Verweilen im Brütschranke vor, so sind als Unterschiede gegenüber der Fig. 4 noch zu verzeichnen:

Fortgeschrittene Vacuolisirung, Rückgang der Färbbarkeit der körnchenlosen Bacillen, vollkommeneres Ausgleichen der Dimensionen der Kügelchen. Dadurch ist der Contrast zwischen kügelchenhaltigen Bacillen und übriger Masse augenfälliger geworden. Letztere scheint einem rapiden Zerfall preisgegeben.

Dass von nun an während drei weiterer Tage die Bilder sich nicht wesentlich ändern, dass ein gewisser Stillstand der Entwickelung der Körner und des Zerfalls der körnerlosen Bacillen eintritt, wird unten erörtert und interpretirt werden. In diesem Zusammenhang sei nur noch eines befremdenden Momentes gedacht. Es stünde nun eigentlich doch zu erwarten, dass bei weiter gediehener Involution endlich fertig gebildete Sporen — wenn anders die blauen Dinge Sporen sind — frei würden und als schwarzblaue Kügelchen ohne braune Anhängsel im Gesichtsfeld auf weissem Grunde sich deutlich abheben würden. Mit einwandsfreier Deutlichkeit haben sie sich mir nie gezeigt. Dagegen musste ein numerisches Zurückgehen der Kügelchen bald die Aufmerksamkeit auf ein neues Element richten, das allmählich die schwarzen Kügelchen zu substituiren scheint. Ich halte mich an ein Präparat, das von derselben Cultur genommen ist, von der die Figg. 2 bis 5 stammen, die aber mittlerweilen 6mal 24 Stunden im Brütschrank zugebracht hatte. Ich übergehe an dieser Stelle jene körnig bepuderten Elemente der Fig. 3, die in diesem Präparate scheinbar paradoxer Weise wieder auftauchen, ich übergehe auch die jugendlichen kurzen Formen, die einen sonderbaren Contrast zu den alten involvirten Formen darstellen, einen Anachronismus gewissermassen; ich betone hier nur eine etwelche Abnahme der grössten und entwickelten Kügelchen und das Auftauchen eines neuen Formelementes. Als farblose Dinge sind sie dem farbenverwöhnten Auge lange entgangen, da sie bei offenem Condensor, bei ausgelöschtem Structurbild nicht recht zur Geltung kommen konnten. Zu leicht verwechselt man sie mit Vacuolen, aber nur so lange, bis man eine mittlere Blende einschiebt, worauf urplötzlich eine Anzahl gelblicher, hellleuchtender Kügelchen von derselben Grösse und Form wie die schwindenden blauen, nun durch ihr ausserordentlich starkes Lichtbrechungsvermögen wirken. Ein Theil dieser neuen Wesen ist einzeln oder zu zweien in Bacillen eingeschlossen, ein nicht geringer Bruchtheil liegt frei. Ist es nun von vornherein durch das umgekehrte Verhältniss, in dem neue farblose glänzende, und alte blaue Kügelchen stehen, wahrscheinlich, dass die neueren aus den älteren hervorgehen, so wird dies noch um so wahrscheinlicher, als es in der That gelingt, Uebergangsformen aufzufinden, die in der Mitte zwischen beiden Entwickelungsstufen stehen. Es konnten nämlich hier und da Kügelchen von starkem Glanz gefunden werden, die nur bei einer be-

stimmten scharfen Einstellung einen deutlichen blauen Punkt im Centrum zeigten. Wie aber der Focus diese Ebene auch nur um ein Minimum passirt hatte, war der Punkt urplötzlich verschwunden und ein grünlich glänzendes Licht von grösserer Ausdehnung und scharfem Umriss trat an die Stelle. Ganz sicher ist es nicht ein bloss optisch täuschendes Phänomen. Das ganze Verhalten dieser Dinge charakterisirt sie als positive Wesen von eigenthümlicher Substanz und schliesst jede Verwechselung mit Vacuolen und dergl. aus. Auch der Vermuthung, es könnte sich um Producte zu weit gediehener Eintrocknung, beziehungsweise Erhitzung handeln, wie sie in unvorsichtig behandelten histologischen Präparaten gelegentlich einmal auftreten, wurde Raum gegeben; doch wurde bald diese Ansicht von der Hand gewiesen, da Präparate früherer Stadien, die skrupulös genau ebenso langsam durch die Flamme gezogen worden waren, die glänzenden Kügelchen niemals zeigten.

Recapituliren wir das Gewonnene und formuliren wir unsere Ansicht von der Entwickelung der Sporen, wie sie Schritt für Schritt an Hand der Bilder eben dargestellt worden ist. Wo immer im Folgenden der Begriff „Sporen" gebraucht wird, geschieht dies stets mit dem Vorbehalt, dass dieser Begriff im späteren Verlauf dieser Mittheilungen noch modificirt und präcisirt werden soll. Aber ich sehe keinen Grund dagegen, in einer abschliessenden Darstellung nicht denselben inductiven Weg zu gehen, den vorher die Untersuchung genommen.

Bei Zimmertemperatur findet nun also eine Sporenbildung des Bac. fluorescens auf Gelatine[1] wenigstens nicht statt, auch bei längerer Beobachtungsdauer (1 Monat) nicht einmal. Auf Kartoffeln sind die Anfänge dazu so dürftig und spärlich, dass sie kaum ein Recht darauf haben, als Ausnahme angeführt zu werden. Kurze Zeit einer Temperatur von 37·5° exponirt, erfahren die Bacillen ein kräftiges Längenwachsthum, zugleich beginnt eine neue Substanz in den Bacillen sich abzuscheiden, erst den Bacillus gewissermassen diffus durchtränkend, bald aber in distincte Tröpfchen ausgeschieden. Wachsthum des ganzen Bacillus und der einzelnen Tröpfchen halten gleichen Schritt und bald gesellt sich dazu eine rückgängige Metamorphose derjenigen Bacillen, die von der Sporenbildung ausgeschlossen sind. Die Colonie entledigt sich ihrer als unnützer steriler Elemente. Sie zerklüften und zerfallen zu einem formlosen Detritus, nachdem sie ein Durchgangsstadium der Vacuolisirung passirt haben. Nun aber tritt ein gewisser Stillstand in der Entwickelung ein. Die sporenhaltigen Gebilde scheinen mit ganz besonderem Wider-

[1] Auf Agar-Agar bei Zimmertemperatur auch nicht und zwar bei einer Beobachtungsdauer von 2½ Wochen. Dasselbe gilt für Cyanogenus.

stand gegenüber den Zerfallvorgängen gewaffnet zu sein. Wenn alle übrigen Bacillen untergegangen sind, so halten sie sich noch längere Zeit, ehe ihr Zerfall die Sporen frei gibt. Mit dem Freiwerden der Spore aber erleidet dieselbe noch tiefgreifendere Umänderungen ihrer Structur und wohl auch ihres Chemismus. Eine Membran, ein Exosporium, das in den früheren Stadien, da die Spore noch in den Bacillus eingebettet lag, kaum existirte, oder wenigstens von einer nicht erkennbaren Zartheit war, fängt an sich zu verdicken und wohl auch zu verdichten, denn nur so ist es verständlich, warum in der Phase des Freiwerdens nur ein punktförmiges Centrum der Spore der früheren Reaction noch zugänglich, bald aber die ganze Spore gegen Farbstoffaufnahme gepanzert ist, die Neisser'sche Reaction ausgenommen. Ist die ehemalige blaue Substanz nun wohl ganz aufgezehrt, nun wohl ganz zum Aufbau der Spore verwendet, etwa so, wie der Eidotter zu Gunsten des wachsenden Embryo aufgezehrt wird, oder ist sie durch den undurchlässig gewordenen exosporen Mantel gegen jede Farbstoffaufnahme geschützt? Dass ein Uebergangsstadium noch ein blaues Pünktchen zeigt, dürfte zu Gunsten der ersteren Ansicht sprechen. In dieser letzten Phase erst tritt die Buchner-Neisser'sche Reaction in ihr Recht; nun erst gelingt es, mittelst starker Erhitzung die Spore mit Fuchsinlösung (in Anilin- oder in Carbolwasser) zu imprägniren, auch Methylenblau ist nicht ausgeschlossen, was Buchner schon betont hat, aber damit komme ich nun auf den principiellen und fundamentalen Unterschied in der ganzen physikalischen und chemischen Action zwischen Buchner-Neisser's Proceduren und meiner Reaction. Die beiden schliessen sich nicht vollständig aus, aber sie lösen einander ab. Zuerst in den Vorstadien (Prophasen) behauptet die meinige allein das Feld, und darin scheint mir ihr Hauptwerth zu liegen; das ist das Neue, was ich hiermit zu bieten hoffen darf. Dann kommt ein intermediäres Stadium, wo beide nebeneinander sich dulden, und endlich gelingt es nur noch kochenden Farblösungen, durch den Sporenmantel durchzuschlüpfen und darin zu bleiben, trotz energischer Behandlung decolorirender Ingredienzien (1 procentige Schwefelsäure oder Salpetersäure-Alkohol).

Ich kann mir nun nicht versagen, noch eine Versuchsreihe in extenso mitzutheilen, auf die ich deswegen Gewicht lege, weil sie mit einer Klarheit und Präcision auf die Fragestellung antwortet, deren man sich in der Naturforschung selten erfreut, insofern sie sich nicht innerhalb der exacten Wissenschaften bewegt.

Den 22./II. 1888 werden die folgenden Culturen untersucht:

1. Eine Kartoffelcultur, die den 9./II. angelegt, vom 9. bis 17./II. im Brütschrank, von da an, also vom 17. bis 22./II. bei Zimmertemperatur gestanden hatte.



2. Eine Kartoffelcultur, die den 9./II. angelegt, vom 9. bis 22./II. unausgesetzt bei Zimmertemperatur gestanden hatte.

3. Eine Kartoffelcultur, die, vom selben Alter wie die anderen beiden, die ganze Zeit vom 9. bis 22./II. stets einer Temperatur von 37·5 ° ausgesetzt gewesen.

1. Makroskopisches Aussehen der Cultur: Ein dunkelbraungelber, sich wenig erhebender, schleimig glänzender Belag von geringer Ausdehnung bildet den Untergrund, auf dem nun einige Dutzend trockener graubrauner matter kugelig prominenter Häufchen aufgeschossen sind, und zwar erst seit dem 17./II., seitdem die Cultur bei Zimmertemperatur gestanden. Im Brütschrank findet ein nur beschränktes Wachsthum statt. Die Colonieen beschränken sich nur gerade auf das Areal, das die impfende Platinnadel gestreift hat. Eine Spur, der Grenze der beiden Substanzen entnommen und als Deckglaspräparat untersucht, zeigt nun deutlich zweierlei verschiedene Formelemente. Einmal lange wellige, leicht knotige Fäden, die sich nur minimal gefärbt haben und viele Vacuolen enthalten (vergl. Fig. 4) und in deren keinem ein blaues Kügelchen gefunden wird. Andererseits ist das Gesichtsfeld überschwemmt von kurzen, plumpen, oft zu zwei stehenden, also eben erst getheilten, mit Safranin oder Bismarckbraun kräftig tingirten Bacillen, offenbar Jugendformen, offenbar Bestandtheile jenes seit dem 17./II. aufgeschossenen Häufchens, während die langen Fäden dem gelbbraunen älteren Materiale zugehören müssen. Diese mehr als wahrscheinliche Vermuthung wird nun vollends zur Gewissheit erhoben, als es gelingt, mit einer dünnen, spitzen Platinnadel von der einen und der anderen Substanz gesonderte Proben zu entnehmen. Da zeigt es sich denn, dass die neu entstandenen Häufchen lediglich aus kurzen, plumpen, gut gefärbten Stäbchen bestehen, die oft zu zweien gepaart erscheinen, und dann an den proximalen und distalen Enden stärker gefärbte Menisken tragen, zwischen denen die Mitte als blasser Fleck ausgespart ist, wie dies für den Bac. cyanogenus in der Arbeit über den Xerosis-Bacillus (Fig. 9) abgebildet und im Text als Theilungserscheinung discutirt worden ist. Auch die kleinen jugendlichen Formen zeigen keine Spur blauer Kügelchen. Die ältere Substanz, die von dem Aufenthalt im Brütschrank noch herstammt, besteht dagegen aus Fäden, die ich als Involutionsformen anspreche und für welche die langen vacuolisirten Fäden der Figg. 4 und 5 (ohne Kügelchen) als Muster dienen mögen.

Am 13., 15. und 17./II., während der Zeit, da die Cultur im Brütschrank stand, waren Proben zur Untersuchung entnommen worden und immer hatten sie die Kügelchen in prägnanter Weise und grosser Anzahl



gezeigt. Erst seitdem die neuen Colonie-Häufchen auf dem alten Untergrund aufgeschossen, sind die Kügelchen verschwunden, dürften also doch wohl zum Aufbau der neu aufgeblühten Colonie verwendet worden sein.

2. Ganz anders sieht diese zweite Cultur aus; ein weit über den Impfstrich verbreitetes Wachsthum einer glänzenden, hellbraunen, sich wohl 1 mm über das Niveau der Kartoffel erhebenden Masse. Den 13., 15. und 17./II. waren Proben entnommen worden, niemals hatte die Reaction auch nur ein einziges blaues Kügelchen zu Tage gefördert. Ebensowenig den 22./II., nach 13 Tagen also. Im Ganzen zeigen die Präparate an den vier genannten Untersuchungstagen übereinstimmende Resultate. Wohl ausgebildete, schöne Bacillenformen, wie sie in Figg. 1 und 2 dargestellt sind, ohne grosse Mannigfaltigkeit, doch überwiegen mit vorrückender Zeit längere, wellige Formen und vom 17./II. an kommen spärliche Formen hinzu, die sich durch ihre schwache Färbung und Vacuolisirung deutlich genug als Involutionsformen ausweisen.

3. Und nun endlich die Cultur, die die ganze Zeit (9. bis 22./II.) im Brütschrank zugebracht hat. Die ganze Cultur zeigt jene oben beschriebene gelbbraune Substanz, die auf ein kleines Areal beschränkt ist und nur da sich entwickelt hat, wo die Kartoffel vom Platindraht berührt worden.

Das Gesichtsfeld des Präparates ist überschwemmt von zerfallenen, undifferenzirbaren, formlosen Detritusmassen, die nach ihrer Configuration hier und da, aber selten, ihre Provenienz aus ehemaligen bacillären Gebilden verrathen. Die einzigen morphologisch bestimmt charakterisirten Elemente sind lange Fäden, oft mit phantastisch abenteuerlichen Verschlingungen (siehe Fig. 9). Mit wenigen Ausnahmen enthalten alle diese Schlingen noch mindestens ein blaues Körnchen, so dass fast der Satz gilt: Nur was Körnchen enthält, ist erhalten geblieben, alles übrige ist zertrümmert und zerfallen. Die wenigen Fäden, die Körnchen vermissen lassen, sind von Vacuolen so durchsetzt, dass sie wie zernagt erscheinen. Durchweg sind die körnerhaltigen Fäden arm an Vacuolen; in Ausnahmefällen combiniren sich jedoch auch beide Elemente.

Interpretation des Versuches.

Drei Kartoffelculturen, von denen jede in ihrer Art behandelt worden war, zeigen ganz verschiedene, für jede wiederum charakteristische Bilder. Da scheint aller Zufall ausgeschlossen und das Gesetzmässige blickt durch. Ich lege den Versuch so aus:

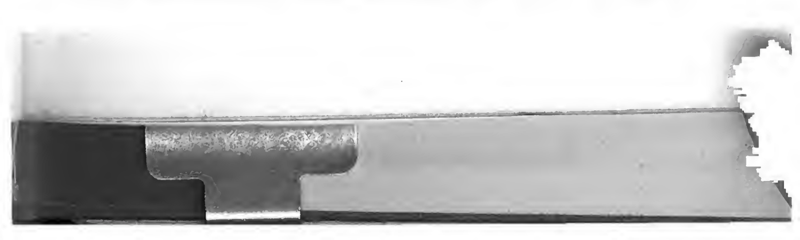
Kartoffelculturen bei Zimmertemperatur aufbewahrt, liefern nie und nimmer blaue Kügelchen;[1] das ist oftmals constatirt und bestätigt worden

[1] Auf die geringe Beweiskraft der scheinbaren Ausnahme der ersten Versuchsreihe habe ich ausdrücklich hingewiesen.



im Laufe dieser Untersuchungen; dagegen zeigen sie ein üppiges reges Wachsthum, das auf dem Wege der Theilung vor sich geht, wie aus den Doppelformen deutlich erhellt. In etwa acht Tagen scheint das Maximum des Wachsthumes erreicht zu sein, denn von da an stellen sich Involutionsformen, wenn auch spärlich und ganz allmählich ein; eine weitere Propagation der Colonie ist aber nicht wahrzunehmen. Wie ganz anders verhält sich die Cultur bei 37°! Nach einigen Tagen bemerkt man eine auf den Impfstrich beschränkte gelbbraune Verfärbung, die dann unverändert so sich Wochen lang hält. Aber wie wir gesehen haben, schon nach 24 stündigem Aufenthalt im Brütschrank sind die Kügelchen da; feine Tröpfchen erst in feinen Bacillen eingelagert. Involution und Zerfall kommen im Brütschrank schneller über die Colonie, zuletzt finden wir auf der ganzen Trümmerstätte von wohlerhaltenen Formelementen nur noch eine Elite zu Schlangen ausgewachsener Bacillen, die mit verschwindenden Ausnahmen grössere, seltener auch kleinere blaue Körner enthalten. Kommt nun eine solche Cultur unter Verhältnisse, die einem rapiden Wachsthum günstiger sind als Brüttemperatur, so kann jederzeit nach zwei- bis dreitägiger Frist eine Vermehrung durch Theilung angefacht werden, so dass da und dort aus der gelblichen Pulpe frische charakteristische Colonieen emporschiessen. Nun aber sind die Körner verschwunden. Was ist aus ihnen geworden? Sind sie verwendet worden zum Aufbau jener neuen Häufchen? Liegt in ihnen der Keim der neuen Entwickelung? Oder welch anderes Formelement ausser ihnen könnte diesen Keim neuen Lebens in sich bergen? Doch wohl nicht der formlose Detritus? Doch wohl ebenso wenig die langen Schlingen, die, insofern sie keine Kügelchen enthalten, den Eindruck regressiver Metamorphose machen durch ihr zernagtes Aussehen. Oder sollten wirklich diese letzteren die Elite von Lebewesen bilden, welche die Mission auf sich zu nehmen haben, Erhalter der Art zu bleiben. Und wenn dem so wäre, weshalb finden sie sich denn noch in der Cultur Nr. 2, wo sie doch alle Zeit und günstigste Gelegenheit gehabt hätten, Urheber eines neuen Geschlechtes zu werden. Alles drängt zu der Ueberzeugung, dass als diese Urheber eben einzig und allein die blauen, runden Elemente angesprochen werden können. Diese verschwinden alle ohne Ausnahme; sie gehen unter zu Gunsten einer neu aufblühenden Generation. Mögen wir sie Sporen taufen oder wie auch immer, dass sie Träger des Lebens, der Entwickelung, der Erhaltung der Art seien, das ist durch diesen Versuch bewiesen; und mehr war von ihm nicht verlangt.

Die makro- und mikroskopischen Befunde der Culturen werfen noch ein aufklärendes Licht auf eine andere wunderliche Thatsache. Bei der zuerst in Scene gesetzten Versuchsanordnung, nach welcher die Figg. 2,



3, 4, 5 gezeichnet sind, befremdete der Stillstand des Befundes von Fig. 5 an. So konnte die Wahrnehmung nicht ausbleiben, dass da und dort täglich Herde kleiner, in Theilung begriffener, jugendlicher Zellen in Klumpen sich um alte, kügelchenhaltige Fäden gruppirten. Im Licht unseres Versuches begreift sich dies nun leicht. Die Kartoffelschale stand im Brütschrank, wurde des Morgens herausgenommen zur Entnahme von Proben. Doch öfter als ein Mal zog sich aus mancherlei, zum Theil äusseren Gründen die Untersuchung über einen halben, ja einen ganzen Tag hin und erst Abends kam die Schale wiederum in den Brütschrank zurück. Natürlich benützten nun die Entwickelungskeime die Gelegenheit, über Tag auszukeimen und sich auf dem Wege der Theilung zu Bacillengrüppchen zu vermehren, doch konnten die jungen, kaum entstandenen Stäbchen diesen Modus nicht lange fortsetzen; denn der Abend mit der Brüttemperatur setzte diesem Treiben ein Ende und beförderte nun Involution einer-, aber auch Körnerbildung andererseits. So erklärt sich diese Schraube ohne Ende, die anfänglich so sehr verblüffte.

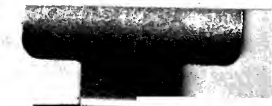
Als Nachtrag gebe ich noch einige den obigen Versuch ergänzende Beobachtungen.

Den 5./III. wird die obige Cultur Nr. 2 untersucht; sie hatte nun vom 9./II. bis 5./III. stets bei Zimmertemperatur gestanden. Es werden schlanke, längere, noch wohlausgebildete Formen von etwas geringerer Färbbarkeit getroffen; nirgends eine Andeutung blauer Körner.

Ferner wird eine Cultur untersucht, die alle Schicksale der Cultur Nr. 1 getheilt hatte, und auch makroskopisch ihr durchaus gleich war. Jüngere, kürzere, gut gefärbte Elemente, viele mit kolbenförmigen Anschwellungen ohne Sporenreaction. Da und dort ein blaues Körnchen in Bacillen eingeschlossen, aber verschwindend wenige. Neben den jungen Elementen lange, dünne, gewundene, blasse, schwach gefärbte Fäden.

Und endlich die Cultur, die stets im Brütschrank gestanden hatte (9./II. bis 5./III.). Fast keine charakterisirten Formen. Alles Detritusmasse. Im Trümmerhaufen da und dort ein kolbiges, missgestaltetes Gebilde mit einem blauen, grossen Korn. Da und dort, aber immerhin selten genug, ein blaues Korn mit leicht röthlich-braunem Contour. Die Körner nehmen den Farbstoff entschieden schwerer an, und einmal gefärbt, entfärben sie sich viel leichter wieder und zwar vom Vor- bis zum Nachmittag in einem Präparat, das in Wasser untersucht, freilich mittlerweile ausgetrocknet und wieder frisch angefeuchtet war. An ihrer Stelle erscheinen nach dem Erblassen helle, lichtbrechende, grünlich-gelbe, kugelige Gebilde.

Im grossen Ganzen stimmen diese Resultate mit denen des vorhergehenden analogen Versuches überein. Auffallend und abweichend dürfte



vielleicht das spärliche Auftreten blauer Körner im zweiten Präparat erscheinen. Denn wenn die obigen Ansichten zu Recht beständen, so müsste postulirt werden, dass alle vom 9. bis 17./II. im Brütschrank gebildeten Sporen die Gelegenheit benutzt hätten, vom 17./II. bis 5./III. zu Bacillen auszukeimen; dass dann der junge Nachwuchs bei Zimmertemperatur keine Sporen mehr zu bilden vermochte. Ist nun das Vorhandensein so spärlicher Körnchen ein Grund, von unserer These abzugehen, dass Bacillus fluorescens bei Zimmertemperatur überhaupt keine Sporen bilde? Im Hinblick auf das beständige Fehlen der Sporen im ersten Präparat, so oft es auch immer untersucht worden, besteht eine solche Nothwendigkeit doch wohl nicht. Ich denke mir eher, dass einige wenige Sporen vom 17./II. her sich in dem dichten Gedränge zu conserviren vermochten, weil sie vielleicht den nöthigen Grad der Feuchtigkeit oder die erforderliche Sauerstoffmenge oder irgend welche, die Auskeimung begünstigende Momente in dem Bacillengewimmel vermissten.

Den 6./III. wird eine grössere systematische Versuchsreihe unternommen und zwar nach der Richtschnur und Wegleitung, die durch die Befunde beim Bacillus fluorescens gewiesen worden waren. Es war mittlerweile eine ziemliche Anzahl von Bacterien auf die Reaction hin untersucht und dabei eine Reihe von Species ausfindig gemacht worden, die eine genauere Untersuchung zu lohnen versprachen. Von diesen war mir Bacillus cyanogenus von früher her bekannt und verhielt sich dem Fluorescens in vielen Dingen analog. Bacillus megaterium wurde deshalb herbeigezogen, weil bei ihm eine typische Sporenbildung von de Bary sehr ausführlich beschrieben ist, und zwar eine Sporenbildung von beinahe schematischem Verlauf. Dementsprechend bildet Bacillus megaterium in verschiedenen Werken de Bary's stets das Paradigma der Sporulation. Wenn also die Körner, die meine Reaction zu Tage fördert, echte endogene Sporen sind, so war ja Aussicht vorhanden, dies gerade an dem so grossen und leicht zu untersuchenden Bacillus megaterium darzuthun. Die Erfahrungen, die ich mit ihm gemacht, sind aber so wenig erfreulich, dass ich ihn hier übergehe, um nicht unnöthig Material zu häufen. Wo er meiner Beweisführung dienlich ist, werde ich ihn noch citiren.

Endlich wurden der Buttersäurebacillus und der wurzelförmige Bacillus herbeigezogen, weil sie gelegentlich positive und jeder in seiner Weise charakteristische, von den erstgenannten Species völlig abweichende Bilder gegeben hatten.



Vier flache Schalen mit je vier Kartoffelscheiben werden ganz gleichmässig beschickt mit dem Wurzelbacillus, dem fluorescirenden, dem Cyanogenus und dem Buttersäurebacillus, die in Folgendem einfach mit **W**, **F**, **C**, **B** bezeichnet werden sollen. Zwei Schalen kommen nun unmittelbar nach der Impfung in den Brütschrank und zwei bleiben bei Zimmertemperatur (durchschnittlich 15° R.).

Untersuchung vom 8./III.

Brüttemperatur.

***W.**[1] Makroskopisch gar nichts auf der Kartoffel zu sehen. Trotzdem finden sich Bacillen genug auf dem Deckglase. 20 bis 30 bis 40 μ lange Scheinfäden, höchstens 1 μ dick. Homogene Beschaffenheit und Färbung der Fäden. Nicht in allen, aber in der Mehrzahl derselben winzige schwarzblaue Pünktchen, die auf keiner Seite die Contouren der Bacillen tangiren, sondern auf beiden Seiten noch ziemlich breite Spatien von Bacillensubstanz übrig lassen. Daneben finden sich hier und da in einem Bacillus, vorzugsweise an dem einen Ende etwas über die Bacilluscontouren prominirende, gelbe, stark lichtbrechende Knöpfchen, an deren centralen Pol sich hin und wieder ein schwarzes Pünktchen anschliesst. Bei genauem Suchen findet man auch Combinationen beider, wo in einem etwas gelberen, glänzenderen Fleck ein blaues Pünktchen ruht (Fig. 1, Taf. VI).

***C.** Einige schleimige, glänzende, bräunliche Punkte und Häufchen auf der Kartoffel. Lange Fäden bis zu 50 μ Länge und $1^1/_2$ μ Dicke von homogen grünlich-gelbem Glanz, dicht von blauen Kügelchen besetzt. Daneben kleine dünne, zarte Elemente von 1 bis 2 μ Länge und $^1/_3$ bis $^1/_2$ μ Dicke, ausnahmslos ohne Kügelchen (offenbar die Reste des ursprünglich auf die Kartoffel ausgestrichenen Impfmaterials). Da und dort eine freie, blaue Kugel im Gesichtsfeld (Fig. 2, Taf. VI).

***F** lehnt sich in manchen Punkten an **C** an. Feucht glänzende, punktförmige Herdchen auf der Kartoffelfläche. Im Präparat zweierlei verschiedene Bacillen, wie eine Mischcultur; lange, dicke, wellige Formen, bis 20 μ lang und 1 μ breit, mit Vacuolen, meist ohne Kügelchen; selten mit kleinen, oft in hellere Flecke eingebetteten Kügelchen. Andererseits kleine, 1 bis 2 μ lange und $^1/_3$ bis $^1/_2$ μ dicke Stäbchen mit so winzigen und spärlichen Kügelchen, dass man sie beim ersten Blick vollständig übersieht und vermisst.

B. Die ganze Kartoffel überwachsen von einer bräunlich-gelben Cultur, in Form einer äusserst zarten, dünnen Haut. $2^1/_2$ bis 4 μ lange, $^1/_2$ μ dicke, ausserordentlich schlanke, dünne, regelmässig und dicht aneinander gelagerte, in Palissaden angeordnete Stäbchen. Keine Spur von Kügelchen. Homogene Beschaffenheit und Farbe der Stäbchen. Keine Differenzirung der Protoplasmen.

Zimmertemperatur (15° R.).

***W.** Deutliche trockene, weissliche, bandförmige, glatte, flache Colonie. Stäbchen viel kürzer, dicker, plumper als im Brütschrankpräparat. 4 bis 5 μ lang und $1^1/_2$ μ dick. Wo längere Gebilde entstehen, sind sie alle septirt

[1] Die mit * versehenen Buchstaben bedeuten: „Positives Resultat der Reaction".

in Einzelstücke von der angegebenen Grösse. Im Gegensatz zum Brütofenwachsthum findet sich eine Differenzirung in zwei Substanzen; gelbe Flecke tauchen auf, in denen hier und da ein blaues Pünktchen steckt. Das numerische Verhältniss sucht Fig. 3, Taf. VI getreu wiederzugeben.

*F. Aus kleinen tuberkel-ähnlichen Häufchen zusammengesetzte, grauliche, schleimige, feucht glänzende Colonie. Lauter kurze, plumpe Stäbchen, $1^1/_2$ bis 2 μ lang, $^2/_3$ μ dick, homogen; hier und da in einem Stäbchen ein blaues Pünktchen, höchst selten je eines an jedem Ende. Trotz der Spärlichkeit von überzeugender Schärfe und Klarheit.

*C.[1] Kleine, der vorhergehenden ähnliche, feuchte Colonie. Zweierlei Elemente: blasse, dünne, schlangenförmig gewundene, enorm lange Fäden von etwa $^2/_3$ μ Dicke; Längendimensionen von 30 bis 40 bis 50 μ keine Seltenheit. Zum grössten Theil aber Bacillen von $1^1/_2$ bis $2^1/_2$ μ Länge und der genannten Dicke. In letzteren und nur in letzteren hier und da, aber spärlich genug, ein blaues Pünktchen, niemals in den langen Fäden!

B. Makroskopisch noch kein Wachsthum zu sehen. Am Deckglas haften auch keine Bacillen.

Untersuchung vom 9./III.

Brüttemperatur.

*W. Grössenverhältnisse dieselben wie gestern, nur zeigen die längeren Formen eine Septirung in Glieder. Bacillensubstanz differenzirt sich. Es entstehen gelbe, helle Felder und Flecken, in denen die blauen Körnchen nicht ausnahmslos, aber vorzugsweise liegen. Einzelne Körnchen sind beträchtlich grösser als andere und als die gestrigen. Hin und wieder liegt eine gelb umsäumte, hellblaue, ovale Spore frei im Gesichtsfeld, ohne dass im Uebrigen alle Uebergangsphasen nachgewiesen werden könnten (Fig. 4, Taf. VI).

*F. Grössenverhältnisse wie gestern; nur sind die langen Fäden bedeutend länger (bis 50 μ). In diesen haben die Körnchen ungemein an Zahl zugenommen. Rosenkranzformen wie gestern bei C. (Fig. 2) sind keine Seltenheit; das Bild hat so viel Aehnlichkeit mit Fig. 2, dass diese füglich für dieses Präparat gelten könnte.

*C. Die langen Fäden doppelt so lang wie gestern. Kugeln angewachsen und vermehrt. An Stelle der feinen Körnchen von gestern sind grosse getreten, die dicht gedrängt im Bacillus liegen. Daneben vacuolenhaltige und zerfallende. Freie, blaue Kugeln im Gesichtsfeld, sehr viele mit bräunlich entfärbtem Centrum und starkem Glanz (bei eingeschobenem Diaphragma).

---

[1] Bei der Wiederholung dieser Versuche im August dieses Jahres beobachtete ich eine Thatsache, die ich weder bei Flügge, noch Fränkel, noch auch bei Eisenberg erwähnt finde und die auch Neelsen nicht angeführt hat. Auf neuen Kartoffeln erhielt ich eine Cyanogenus-Cultur, deren Masse selbst eine dunkelspangrüne Farbe annahm, die, vom zweiten Tag auftretend, täglich dunkler und intensiver wurde. Die nächste Umgebung der Cultur färbte sich eisen- oder schiefergrau. Ob es sich in diesem Falle um eine botanische Varietät, ähnlich wie bei dem von mir beschriebenen Bac. pyocyaneus β handelt, oder ob die neue Kartoffel eine solche Farbstoffproduction begünstigt, habe ich nicht weiter untersucht. Nur spricht für letzteres der Umstand, dass alle Culturen auf neuen Kartoffeln viel schöner und charakteristischer wuchsen.



Auch von den im Bacillus lagernden Kugeln beginnen einige sich im Centrum zu entfärben und stärker zu leuchten (Fig. 5, Taf. VI).

B. Grössenverhältnisse wie gestern. Makroskopisch bedeutend fortgeschrittenes Wachsthum und stärkere Bräunung der Kartoffel. Homogene braune Färbung des Bacillus, keine Differenzirung der Substanz. Keine blauen Punkte.

Zimmertemperatur.

***W.** Dimensionen wie gestern. Jedes Stäbchen scharf differenzirt in zwei Substanzen. Gelbe Ellipsen, in denen blaue ovale Körper liegen, an dem einen Pole eine bräunliche, dunklere Substanz. Je zwei Stäbchen gruppiren sich zusammen mit den gelben Polen oder mit den braunen sich berührend. Hier und da wechseln sie so ab, dass sie mit den gleichen Polen nach derselben Richtung sehen. Schon freie Sporen mit gelber Umsäumung (Fig. 6, Taf. VI).

***F.** Dimensionen dieselben. Alles übrige stimmt mit der gestrigen Beschreibung überein.

C. Genau wie gestern. Nur sind die langen Fäden verschwunden, nur kurze sind noch da. Kügelchen sind nicht mehr aufzufinden.

B. Makroskopisch kein sichtbares Wachsthum. Am Deckglas jedoch haften einige Bacillen von derselben Grösse, wie die im Brütschrank gewachsenen; homogene Structur, keine Körnchen.

Untersuchung vom 10./III.

Brüttemperatur.

***W.** Im wesentlichen keine Aenderung gegenüber gestern, so dass die gestrige Zeichnung (Fig. 4) noch genau für heute passt. In den Dimensionen hat sich nichts geändert. Dagegen nehmen die blauen Pünktchen in den gelben Höfen rapide ab, die gelben Flecke sind dagegen geblieben, die längeren Fäden zeigen kolbenförmige und spindelähnliche Anschwellungen, die ampullenartig den Bacillus da und dort auftreiben. Auch schleifenähnlichen Windungen begegnet man. Man hat den Eindruck, es handle sich um einen schüchternen Versuch zur Sporenbildung, der aber vor vollendeter Reife abortirt, weil ja doch das Bild gegenüber gestern und vorgestern den Eindruck von Involutionsformen erweckt (Fig. 7, Taf. VI).

***F.** Das Bild erinnert an das gestrige. Länge der Fäden noch beträchtlicher, doch enthalten die allerlängsten (bis zu $80\,\mu$) keine oder nur wenige Körnchen (vgl. Fig. 9, Taf. V). Dann nehmen heute abenteuerliche Involutionsformen sehr überhand. Birn-, Keulen-, Sanduhrformen; einzelne Keulen sind bis $3\,\mu$ dick. Zahlreiche Bilder rosenkranzförmiger Anordnung der Körner, ganz analog dem Bild von **C.** in Fig. 2. Den früheren Tagen gegenüber fällt auf, dass freie Kügelchen einzeln und in Gruppen angetroffen werden, oftmals mit fetzigen Anhängseln, oftmals in Reihen angeordnet, wie sie im Bacillus lagen, offenbar also kaum erst frei geworden.

***C.** Alles tritt heute in den Hintergrund vor den kugelhaltigen Fäden. Vacuolisirte Elemente sind fast ganz verschwunden, ein Beweis dafür, mit welchem Recht jene Formen als Involutionsformen, als dem Untergang ge-



weihte Elemente angesprochen worden. Daneben fällt noch mancherlei auf. Lange Fäden sind wieder erschienen, die gestern in den Hintergrund getreten waren, die wie in Fig. 2 kleinste Pünktchen tragen, manchmal davon fast wie bestäubt erscheinen. Dann aber haben die ringförmigen Dinge sehr überhand genommen und zwar gelingt es noch besser als gestern, den Uebergang von compacten blauen Kugeln in die Ringe zu statuiren. Nicht selten begegnet man Fäden, an deren einem Ende grosse blaue Kugeln beginnen, die nach der Mitte zu etwas abnehmen und ganz allmählich in Ringe übergehen, anfänglich in solche mit einem blassen lichten Punkte in der Mitte, allmählich aber in einen dünn contourirten Reif, von eigenthümlich starkem bräunlichen Glanz, der bei eingeschobenem Diaphragma namentlich sich geltend macht und von sonderbarem Contour, der an die optische Erscheinung kleiner Luftbläschen erinnert (Fig. 8).

***B.** Hier und da erscheinen heute doch blaue, ovale Dinge, noch nicht so ausgebildet freilich wie in Fig. 6, aber im Bacillus noch eingeschlossen, von zarten, bräunlichen Hüllen umgeben.

Zimmertemperatur.

***W.** Allmählich überhand nehmende Auflösung der bacillären Rudimente und continuirlicher Uebergang in freie Sporen (Fig. 9). Die Dimensionen der letzteren betragen 2 μ und $1^1/_3\,\mu$.

***F.** Kein Fortschritt gegen gestern. Nur nach langem Suchen hier und da ein winziges, blaues Pünktchen.

***C.** Nach mühevollem Suchen zwei blaue Pünktchen im ganzen Präparat gefunden.

B. Das Bacillenprotoplasma ist weniger homogen, als dasjenige der im Brütschrank gewachsenen.

Untersuchung vom 11./III.

Brüttemperatur.

***W.** Ueberhandnehmen der Kügelchen und der gelben eiförmigen Flecke.

F. Fast vollständiger Schwund der Kugeln. Keine langen Schlangenformen mehr. Frei im Gesichtsfeld liegende, glänzende, grünliche Kügelchen, die sich jetzt nach Neisser färben.

C. Successive Entfärbung der Kugeln und Erscheinen grünlich glänzender, grosser, zum Theil schon freier Kugeln mit intensivem Lichtbrechungsvermögen, die sich nun nach Neisser färben (Fig. 11, Taf. VI).

***B.** Deutliche, wenn auch spärliche, gedunsene Stäbchen, die in der Mitte einer hellen, ovalen Stelle einen blau gefärbten Kern tragen, daneben endständige, hüllenlose, ovale, blaue Körner und ganz freie, welche die in Stäbchen eingeschlossenen an Grösse überragen (Fig. 8, Taf. V).

Zimmertemperatur.

***W.** Wie gestern. Die eingeschlossenen, blauen Ovale färben sich schlechter, dagegen treten blaue Pünktchen von winziger Gestalt in dem gelblichen, übrigen Theil des Bacillus auf, oft zu mehreren.

*F. Merkliche Zunahme der blauen Pünktchen.

*C. Wie gestern, erst nach mühsamem Suchen einige Kügelchen.

B. Wie gestern.

Untersuchung vom 12./III.

Brüttemperatur.

*W. Bilder wie Fig. 4 persistiren immer noch, doch gehen die Kügelchen bedeutend zurück an Zahl, die Bacillen verlieren ihre scharfen Contouren, erleiden mannigfache Varicositäten von gelblichem, fettähnlichem Aussehen, Auch freie, gelbliche Kugeln und Keulen von allen Grössen frei im Gesichtsfeld, offenbar keine Sporen im Hinblick auf die Figg. 3, 6, 9, worin doch der Sporencharakter ein für allemal ausgeprägt ist.

F. Alle blauen Kugeln und langen Fäden verschwunden. Trümmer- und Detritusformen über das Gesichtsfeld zerstreut. Keine wohl erhaltenen Formelemente. Kurze, plumpe Fragmente.

*C. Persistenz einiger weniger, schwarzer Kugeln, die grösstentheils zur Hälfte entfärbt sind, wie in der Fig. 11, sonst keine charakteristischen Formelemente mehr; nur gegenüber F muss hervorgehoben werden, dass eine ziemlich grosse Anzahl langer, schlangenähnlicher Fäden noch übrig geblieben, allerdings durch Vacuolen und Varicositäten sehr entstellt, daneben kurze, plumpe Fragmente. Einzelne der freien Kugeln färben sich nach der Neisser'schen Sporenmethode.

B. Keine blauen Kerne mehr, aber freie, ovale, hellblaue Sporen.

Zimmertemperatur.

*W. Keine wesentlichen Unterschiede gegenüber gestern, als dass die freien, blauen Sporen an Zahl zugenommen haben; viele tragen noch eine gelbliche Hülle rings herum. Hingegen haben die Anfangsstadien der Körnerphase abgenommen.

Wird nun in dieser Phase das Deckglaspräparat abgenommen und nochmals mit Methylenblau gefärbt, aber nun unter mehrmaligem Aufkochen, so erscheint die Mehrzahl der in die Stäbchen noch eingeschlossenen blauen Ellipsen intensiv blau, gleich den freien mit dünner Hülle umgebenen Sporen, gleich intensiv, wie sie bei gelinder Wärme sich in Fig. 6 färbten; das heisst: morphologisch ist gegenüber Figg. 6 und 9 kein wesentlicher Unterschied zu verzeichnen, als dass man jetzt, um dieselben Bilder zu erhalten, kochende Farbe einwirken lassen muss, während früher leicht erwärmte Lösung eindringen konnte. Es muss eine Verdichtung der Hülle stattgefunden haben.

*F. Rapide Zunahme der blauen Körner, so dass jedes dritte bis vierte Stäbchen ein Körnchen birgt. Sonst keine Grössenveränderungen der Bacillen. Die kügelchenhaltigen Exemplare sind etwas kürzer und dicker geworden; erscheinen oft in Wetzstein- und kurzen Spindelformen.

C. Es werden keine Kügelchen mehr gefunden.

B. Schlanke Stäbchen ohne Veränderungen gegen früher.

Untersuchung vom 13./III.

Zimmertemperatur.

Beschreibung des makroskopischen Aussehens der Culturen (genau nach einer Woche).

W. Flacher, über den grössten Theil der Kartoffel ausgebreiteter, exquisit trockener, weissgrauer, spröder, krümeliger Belag.

F. Auf das Centrum der Kartoffel beschränkter, in einzelnen runden Wärzchen aufschiessender, ca. 1 ^{mm} hoher Belag von buchtigen Contouren, feuchtem Glanz, etwas schleimiger Consistenz und von leicht hellbraunröthlicher Farbe.

C. Auf kleine Centren beschränkte, leicht granulirte, trocken matte, braungraue, flache, kaum eine messbare Höhe betragende Colonie. Das Kartoffel-Areal ringsum intensiv stahlgrau verfärbt.

B. Bläulich-grauer, flacher, schleimig-gallertig glänzender, fadenziehender und sich in Form eines schleimigen Häutchens ablösender Ueberzug. Im Centrum stärker ausgetrocknet; bildet daselbst eine fein gefältelte, runzelige, einen Stich in's Gelbliche annehmende Haut.

Mikroskopisches Verhalten.

***W.** Wie gestern, nur sind sehr viele Sporen frei geworden, so dass ganze Gruppen von acht bis zehn freien Sporen da und dort im Gesichtsfeld liegen. Sehr schön gelingt das Experiment von gestern, dass nämlich die freien und die fortgeschritteneren, aber noch eingeschlossenen Sporen erst durch kochende Farbe tingirt werden, kleinere blaue Kerne durch gelinde erwärmte Lösung.

***F.** Wie gestern, vielleicht eher eine geringe Abnahme der Kügelchen. Unfreiwillig wird bei dieser Gelegenheit wieder die alte Erfahrung bestätigt, dass die Reaction misslingt, sobald die Farblösung in's Kochen geräth. Erneute gelinde Erwärmung eines neu bestrichenen Deckglases zeigt prägnante Reaction.

C. Keine Kügelchen.

B. Immer noch dasselbe Bild.

Brüttemperatur.

***W.** Höchst eigenthümliches und befremdendes Bild, langgestreckte, wellige und schleifenförmig gewundene Formen. Alle Stäbchen in Glieder septirt, von denen weitaus die meisten ein blaues Pünktchen am einen Ende tragen; auch recht grosse Körnchen werden da und dort getroffen. Neben den Körnern erscheinen in den Stäbchen von Zeit zu Zeit helle, rundliche und ovale Lücken von gelber Farbe und stärkerem Glanz; in einigen Fällen liegt das blaue Korn neben der gelben Ellipse, oft auch darin, so dass ein hellgelber, stark glänzender Ring das blaue Kügelchen umgreift (Fig. 7).

F. Alle Kügelchen verschwunden, das ganze Gesichtsfeld voll Involutionsformen.

C. Gar keine kenntlichen Formen mehr. Dass dieser Mangel nicht von einer unrichtigen Ausführung der Methode abhängt, zeigt zufälliger Weise ein Diplococcus, der sich als Verunreinigung auf diese Kartoffel verirrt hatte und der die Reaction auf's Prompteste und Eleganteste beantwortet, ganz nach der Fig. 7 meines erwähnten Aufsatzes. (A. a. O.)

* **B.** Heute fallen neben sehr vielen, freien, ovalen Sporen und wenigen eingeschlossenen, blauen Kernen noch Formen auf, die von ovaler Gestalt sind, frei im Gesichtsfeld zerstreut liegen und in schwach lichtblauem Mantel einen intensiv dunkelblau gefärbten Kern bergen (siehe Fig. 8, unten und oben links [der Einfachheit halber sind diese Formen der Fig. 8 eingezeichnet]). Taf. V.

Die unter dem 13./III. beschriebene, bei Zimmertemperatur gewachsene Cultur[1] wird nun in einen Brütschrank gestellt, der auf 30° C. eingestellt ist. Die zu Grunde liegende Erwägung ist folgende: Einer früher entwickelten Ansicht gemäss hätte nun eigentlich erwartet werden sollen, dass ein neues Element, die freie fertiggebildete Spore, an die Stelle der verschwundenen blauen Kügelchen treten müsste, dass also auf Neisser's Reaction hin geprüft, in den beiden Präparaten von **F** und **C** schon gestern zahlreiche rothe, freie Kügelchen erwartet werden dürften. Dem ist nicht so. Beide Präparate, nach Neisser gefärbt, lassen irgend ein charakteristisches Element von der postulirten Beschaffenheit durchaus vermissen.[2] Es drängt sich nun eine neue Vermuthung auf, mit der übrigens die Befunde bei **W** durchaus im Einklang stehen. Es dürfte vielleicht die Temperatur von 37·5° C. der Sporulation nicht eben günstig sein, wie denn ja auch der Milzbrandbacillus bei dieser Temperatur wohl einen Anlauf zur Sporenbildung nimmt, aber keine rege Sporulation zu Ende führt. So mögen die hier geprüften Bacillensorten eine Sporenbildung vielleicht einleiten, aber ehe die Spore ihre volle Ausbildung, ihre volle Resistenz und Unabhängigkeit erlangt hat, fällt sie einer regressiven Metamorphose anheim, wofür die absurden Formen der Fig. 11 wohl genügend Zeugniss ablegen. Bei **W** haben wir sogar das Eigenthümliche erlebt, dass Brüttemperatur keine, Zimmertemperatur dagegen classische Sporulation anbahnt.

Wie hat nun die Temperatur von 30° zunächst das makroskopische Wachsthum der Culturen beeinflusst?

Untersuchung vom 14./III.

W. Kein Unterschied gegen gestern.

F. Schleimigere Consistenz und feuchterer Glanz, Granula der Oberfläche verstrichen, bräunliche Säume um die Colonieen.

C. Kaum ein Unterschied, höchstens stahlgraue Färbung der Kartoffel intensiver.

B. Schleimige Beschaffenheit verloren gegangen; Colonie trockener, consistenter, überzieht die ganze Kartoffel als feines, gefälteltes, runzeliges Häutchen. Ein grünlicher Farbenton taucht auf.

---

[1] Die Culturen gerade in diesem Zeitpunkt unter modificirte Temperaturbedingungen zu bringen, erscheint deswegen angezeigt, weil alle vier Culturen wohlgebildete und charakteristische bacilläre Formen aufweisen.

[2] Einzelne positive Ausnahmen siehe unter 12. u. 13./III. (bei Brüttemperatur.)

Mikroskopisches Verhalten.

*W. Keine wesentliche Aenderung.

F. Keine grösseren Kügelchen. In einzelnen unförmlichen Protoplasmaschollen einige (bis zu sechs) winzige Pünktchen.

*C. Zeigt zahlreiche Kügelchen, circa jeder zehnte Bacillus besitzt welche; öfters stehen sie in dichten Reihen innerhalb eines einzigen Stäbchens.

*B. Während nun also der Buttersäurebacillus bis jetzt niemals eine Andeutung von Kern- oder Sporenbildung bei Zimmertemperatur gezeigt hatte, haben sich nun in derselben, doch schon so oft untersuchten Cultur in 24 Stunden bei 30° jene angeschwollenen Formen mit blauen Kernen (Fig. 8 links oben), in zwar spärlicher Anzahl, aber schön ausgeprägt gebildet. Freie Sporen einerseits, jene Anfangsstadien minimaler, blauschwarzer Punkte im Bacillen-Protoplasma andererseits, werden trotz eifrigen Suchens vermisst, wohl wiederum ein Beweis für den vergänglichen (ephemeren) Charakter der letzterwähnten Phase. Dieses Durchgangsstadium scheint nun freilich gerade beim Buttersäurebacillus eine kürzere Dauer als bei anderen Sorten zu haben und kann, wie die Erfahrungen an dem **W**-Bacillus beweisen, durch gewisse Einflüsse (Temperatur u. s. w.) protrahirt werden. Es macht mir auch den Eindruck, dass da, wo die Reaction versagt, eben diese protrahirenden Einflüsse noch nicht haben gefunden werden können, was bei der erforderlichen Abstufung und mannigfaltigen Modification der Versuchsbedingungen nicht Wunder nehmen darf.

Dieser Ausweg hat für mein Gefühl viel mehr Natürliches und Befriedigendes als die Annahme, dass die Kügelchen in manchen Bacillen gebildet werden, in manchen nicht, und trotz meiner Eingangs erwähnten Vermuthung, die Staphylo- und Streptokokken betreffend, neige ich für mich eigentlich mehr zu der Hoffnung, dass es eines Tages auch gelingen wird, das Kügelchenstadium des Streptococcus nachzuweisen, oder der obigen Darlegung conformer ausgedrückt, die Bedingungen herauszufinden, die der Körnerbildung im Streptococcus günstig sind. Dass ich mich vorerst mit Vorliebe mit Species abgegeben die sich der Reaction willfährig gezeigt haben, und diejenigen bei Seite gelassen habe, die grössere Schwierigkeiten machten und sich lange sträubten, kann mir nicht übel genommen werden. Das Versuchsmaterial ist schon so zu einer Fülle angewachsen, die sich, wie ich merke, schwer einer geordneten Darstellung fügt.

Untersuchung vom 15./III.

2 mal 24 Stunden Aufenthalt bei 30°.

*W. Auffallend grosse Anzahl Zellen im Körnerstadium, dunkelblaue Ellipsen mit hellblauem Hof, beiderseits mit bräunlichen Anhängseln. Schwach blau gefärbte, freie Sporen, viele kleine, verkrümmte und verkrüppelte Involutionsformen.

F. Keine Kügelchen. Unförmliche Klumpen und Klümpchen, wenig wohlerhaltene Bacillen.

*C. Recht ansehnliche Zahl von Kügelchen, vier bis sechs in einer Reihe in grösseren Exemplaren; bei beiden, Kügelchen und Stäbchen, ist von jenem

excessiven Wachsthum, wie bei 37·5° (Fig. 11) keine Spur zu sehen. Die Kügelchen bleiben klein und punktförmig.

*B. Einzelne Körnerstadien, wenig freie, wohlgebildete Bacillen.

Ferner wird den 15./III. untersucht:

Eine Schale mit denselben Kartoffelculturen, die aber den 14./III. frisch von Kartoffelculturen abgeimpft und sofort einer Temperatur von 30° exponirt worden waren.

*W. Ziemlich genau dasselbe Bild wie Fig. 3, also wie nach 24 stündigem Wachsthum bei Zimmertemperatur. Vielleicht sind die Stäbchen etwas schlanker wie dort, die Differenzirung der beiden Substanzen weniger scharf. Aber die Kügelchen sind noch reichlicher, Bacillen frei von solchen äusserst selten. Das Bild ist von überraschender Regelmässigkeit und Eleganz.

F. Kurze, kleine Stäbchen von seltener Regelmässigkeit der Anordnung und Grösse, keine Kügelchen. Dimensionen 1 bis $1^1/_3$ μ lang, $^1/_2$ bis $^2/_3$ μ breit.

C. Schön ausgebildete Bacillen, 3 bis 4 μ lang und $^2/_3$ μ dick, von Kügelchen nicht die Spur.

B. Dimensionen: 1·5 bis 2 μ, höchstens 4 μ lang, $^1/_3$ μ breit, schlank, palissadenförmig aneinander liegend, keine Pünktchen, keine Kerne und dergleichen, keine freien Sporen.

Untersuchung vom 16./III.

Frische Culturen, die vom 14. bis 16./III. bei 30° gewachsen.

*W. Dimensionen: 5 bis 6 μ lang, $1^1/_2$ μ dick, entspricht ziemlich genau der Fig. 3, nur noch mehr Andeutung an Uebergangsformen zu Fig. 6. Auffallend mag immerhin erscheinen, dass die Bilder der bei 30° gewachsenen Culturen mehr Aehnlichkeit haben mit denen der Zimmertemperatur, als mit denen der Figg. 1, 4, 7 (37·5°).

F. Keine Kügelchen.

C. Gut gebildete Bacillen, keine Kügelchen.

*B. Entspricht dem Bild Fig. 8, Taf. V nur ohne das erste Stadium der schwarzen Punkte.

Untersuchung vom 18./III.

Frische Culturen, die vom 14. bis 18./III. bei 30° gewachsen.

*W. Bilder, die Fig. 3 entsprechen, aber noch mehr wie vorgestern zu Fig. 6 hinneigen, bilden eine höchst erwünschte Ergänzung des Formenkreises (Figg. 5, 6, 9). Kügelchen haben gegenüber Fig. 3 wesentlich an Grösse zugenommen, haben hier und da ein etwas helleres, bräunlich leuchtendes Centrum, so dass sie als dicke Ringe erscheinen, wie sie auch bei Cyanogenus im Brütschrank gesehen worden waren (Fig. 8). Namentlich bei Anwendung einer mittelstarken Blende kommt die Ringform zum Vorschein (Fig. 12).

F Kurze, dünne, wohlcharakterisirte Bacillenformen, keine Spur von Kügelchen.

*C. Zahlreiche Kügelchen. In längeren Stäbchen 3 bis 4, öfters 2 und 1, dann meist endständig. Ganze Reihen minimalster Pünktchen.

*B. Präparat wimmelt von blassblauen, freien Sporen, Uebergangsformen kaum mehr.

Hier kann das Protokoll abgebrochen und das weitere Wesentlichste in aller Kürze noch mitgetheilt werden.

Wachsthum bei Zimmertemperatur vom 6. bis 20./III.

C. und F. weder Sporen noch Körner.

W. und B. Ziemlich viel freie und halbfreie Sporen, ersterer mehr wie letzterer, Uebergangsformen (Körnerstadium) nur bei W, aber erst bei intensivstem Suchen.

Wachsthum bei 37·5° vom 6. bis 20./III.

B. mit viel freien Sporen. Die anderen drei nur Involutionsformen ohne alle charakteristischen Elemente.

Wachsthum bei 30° vom 14. bis 21./III.

Freie und im Werden begriffene Sporen bei W und B, bei letzterem anscheinend protrahirte Sporulation, da die meisten sich ziemlich intensiv blau färben und eine hellblaue Randzone tragen.

Nach Verlauf von drei Monaten, am 6./VI., werden alle vier Culturen, die bei Zimmertemperatur gestanden haben (die anderen sind eingetrocknet), auf ihre Fortpflanzungsfähigkeit geprüft. Es entwickelt sich W in seiner charakteristischen Mycel-Form, es wächst F mit schöner Fluorescenz, es geht B an, aber es bleibt C aus.[1] Die mikroskopische Untersuchung wird uns dies Verhalten aufklären, aber nur zum Theil.

W. Grosse Sporenmassen, wenig oder kaum gefärbt; ein Bruchtheil derselben mit intensiv blauem Kern und hellem, kaum gefärbtem Mantel.[2] Viele verkrüppelte Involutionsformen ganz und gar ohne Kügelchen.

F. Weder nach Neisser's, noch nach unserer Reaction gelingt der Nachweis sporenähnlicher Dinge oder Körnchen. Zusammengesinterte, undifferenzirbare Masse, deren Zusammensetzung aus Bacillen nur hier und da klar wird.

C. Viel ausgeprägtere bacilläre Charaktere als bei F, kaum Involutionsformen, keine Sporen oder Körner. Den Bacillen sollte man Fortpflanzungsfähigkeit viel eher zutrauen als F, wiederum eine Warnung, über Leben und Tod der Bacterien nicht nach ihrem morphologischen Aussehen zu urtheilen.

B. Ausschliesslich Sporen, die zum grössten Theil nur schwach, zum kleinen Theil mit intensiv blauem Kern gefärbt werden. Nach der Neisser'schen Methode intensivere Färbung, manche ebenfalls im Centrum etwas dunkler. Daneben wohlgebildete Bacillen.

---

[1] Diese Culturen (Gelatine-) werden den 13./IV. auf die Reaction hin untersucht. W zeigt das Bild der Fig. 3 (ganz ohne Sporen), F keine Spur von Körnchen, B rege Theilung schön geformter Bacillen ohne alle Kügelchen.

[2] Auch nach Neisser färben sich alle Sporen roth, einige etwas blasser, einige mit dunkelrothem Kern und ungefärbtem Hof.

Zweier Präparate muss ich anhangsweise hier noch erwähnen, weil sie Bezug auf Zeichnungen der Tafel nehmen.

Zu Fig. 6, Taf. V. Der Buttersäurebacillus bildet auf Kartoffeln im Verlauf eines Monates (7./II. bis 7./III.) einen braunen, sammtweichen Ueberzug. In gewohnter Weise gefärbt, begegnen uns wohlgebildete Bacillen, die sich in den Dimensionen kaum von zweitägigen Kartoffelculturen unterscheiden. Dazwischen liegen zerstreut oblonge, blaue Dinge, einzelne frei, andere auf Bacillen sitzend, wie Pflaumen am Stiel.

Zu Fig. 7, Taf. V. Eine Kartoffelcultur des Bacillus cyanogenus, die vom 7./II. bis 7./III. bei Zimmertemperatur gehalten worden, zeigt die Bacillen in zwei Lager geschieden. Einmal finden sich kügelchenfreie Bacillen von kurzer Gestalt, die, breit und etwas plump, nicht ganz homogen, zu zerfallen scheinen. Die körnchenhaltigen aber sind schlanker, dünner. Uebrigens kennzeichnet die helle, blaue Farbe der Körner diese als Sporen, gegenüber den schwarzen Körnern der Figg. 2, 5, 8, 11, was auch durch ein höchst intensives Lichtbrechungsvermögen bei eingeschobenem Diaphragma bestätigt wird.

Sind nun die etwas weitläufigen Aufzeichnungen über eine verhältnissmässig geringe Anzahl von Bacterien lediglich dem Bestreben entsprungen, das Neue und Ungewohnte nicht sowohl auf eine sehr breite Basis, als vielmehr auf ein tieferes Fundament zu stellen, so sind damit auch dem Nachuntersuchenden die Wege geebnet, zu denselben Resultaten zu kommen. Es ist unschwer, zu erkennen, wie ähnlich sich Fluorescens und Cyanogenus verhalten haben, wie anderen Gesetzen der Wurzelbacillus folgte, wiewohl auch der einem allgemeinen Hauptgesetz unterliegt, und wie wenig Verwandtschaft mit diesen Haupttypen der Buttersäurebacillus an den Tag legte. Wir haben bei **F** und **C** jene sonderbaren neuen Elemente im Keim ihrer Entwickelung beobachten, wir haben sie dann im Stadium einer stürmischen Production verfolgen können, bis zu einem Punkt, da sie der bisher beliebten Färbung sich plötzlich wenig geneigt zeigen und durch ihre Färbbarkeit mittelst der Neisser'schen Methode sich als Sporen verrathen. Wenn nun dieser Schlussfolgerung vielleicht der Vorwurf gemacht werden kann, sie sei mehr einem Nacheinander als einem Nebeneinander der Bilder entsprungen, so habe ich die Genugthuung, den Uebergang der „sporogenen Körner", wie wir sie in der Prophase wohl nennen dürfen, in eigentliche und echte Sporen in ein und demselben Präparat am Wurzelbacillus demonstriren zu können. Deswegen möchte ich auf die Fig. 12, Taf. V als auf eine Hauptstütze meiner ganzen Argumentation ganz besonders aufmerksam machen. In den gelblichen ungefärbten Tropfen, die anfänglich noch gar nicht Miene machen, sich nach Neisser's Methode zu färben, und wenn sie soweit gediehen sind, sich alsdann in toto mit warmem Carbolfuchsin imprägniren (s. Fig. 15, Taf. VI), in den gelben Ellipsen drin liegen die schwarzen runden Körner. Mit einer Dehnung der letzteren in's Ovale geht nun der Uebergang des

Schwarz in Dunkelblau Hand in Hand. Aber immer bleibt noch ein gelbliches ungefärbtes Rändchen. Die Entfärbung geht vor sich bis zum Hellblau und parallel damit wird das Rändchen dünner und dünner. Jetzt oder etwas später, wenn vom Rändchen nichts mehr übrig ist, hat die Spore ihre Reife erreicht und kann frei werden, aber den Namen Spore verdient sie schon lange, von dem Moment an, da der pechschwarze Punkt sich anfängt zu bläuen; denn dies ist der Zeitpunkt, wo die Neisser'sche Reaction verfängt. Diese Grenzlinie ist weder sehr künstlich, noch willkürlich; ich halte sie für rationell und praktisch. Die Erfahrungen, die ich am Wurzelbacillus sammeln konnte, haben mich zu der Auffassung bestimmt, dass die schwarzen Körner wirklich die Vorläufer, die Keime der Sporen seien und nicht etwa ein für die Sporulation irrelevantes accessorisches Element, das zufälligerweise gleichzeitig mit den Sporen auftauche. Dass ich deswegen im Stande sei, den eigentlichen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden sich so verschieden äussernden Stadien anzugeben, das ist freilich damit noch nicht gesagt.

Typhusbacillus.

Die Frage der Sporenbildung beim Typhusbacillus ist immer noch in einer Phase, dass es sich verlohnt, sich mit ihr abzugeben. Den litterarischen Status quo dieser Frage hier auseinandersetzen, hiesse Seitz's vortreffliches Resumé [1] abschreiben. Ich fühle keine Veranlassung hierzu. Den gewichtigsten Impuls hat die Frage neuerdings durch Birch-Hirschfeld's [2] hübsche Versuche im gefärbten hängenden Tropfen erfahren, auf deren Lücken aber Baumgarten [3] und Ali Cohen genügend hingewiesen haben. Dass die Sporen die Farbe begieriger aufnehmen sollen als die Bacillen, ist schwer verständlich, obgleich Andere Aehnliches gesehen haben wollen.[4] Wie dem auch sein möge, den meisten Untersuchern ist die grosse Resistenz der Typhusbacillen gegen Eintrocknung [5] aufgefallen, ja Andere [6] haben sogar Unterschiede im Verhalten gegenüber hohen Temperaturen gefunden. Manche Culturen ertrugen 90° ohne Schaden, andere nur 45°, stärker erwärmt, büssten sie ihre Fortpflanzungsfähigkeit ein.

---

[1] *Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde.* Bd. II.
[2] *Archiv für Hygiene.* 1887. Hft. 4.
[3] *Jahresbericht für 1887.*
[4] Vilchour, *Lancet.* 1886. Vol. II. Nr. 3.
[5] Seitz, *Bacteriologische Studien zur Typhusätiologie.* München 1886, und Birch-Hirschfeld, a. a. O.
[6] Chantemesse et Widal, *Gaz. hebdom.* 1887. Nr. 9 und *Archives de physiol.* 1887, Nr. 2.

Das sind alles Dinge, die dem Vorhandensein resistenterer Dauerformen das Wort reden. Dass solche Wesen vorhanden sein müssen, davon ist Jedermann überzeugt, wenn man sich auch gestehen muss, dass der tadellose Beweis ihrer Existenz noch aussteht.[1] Es hatte also einen gewissen Reiz, den Typhusbacillus der Reaction zu unterwerfen, da er sich bisher noch keiner anderen Doppelfärbung hat fügen wollen. Mit Versuchen, die über die Resistenz solcher Dinge Aufschluss hätten geben können, habe ich mich nicht befasst, kam es mir doch lediglich darauf an, an grösserem Material den Werth oder Unwerth meiner Farbencombination zu beurtheilen. Dieses Geständniss schliesst sofort auch das zweite ein, dass wegen des genannten Mangels von einer endgiltigen Beweisführung gar nicht die Rede sein kann. Das ist auch ein Thema für sich, ein Object besonderer ausgedehnterer Versuchsreihen.

Nach vielen vergeblichen Versuchen zeigt der Typhusbacillus zum ersten Male prompte und unzweideutige Reaction den 19./IV und zwar in einer Bouilloncultur, die zwei Mal 24 Stunden (16. bis 18./IV.) bei 37·5⁰ gestanden hatte und dann noch 24 Stunden (18. bis 19./IV) bei Zimmertemperatur gehalten worden war. Betrachten wir Fig. 16 *a*, Taf. V. Da sind vorerst kurze Stäbchen von 1 bis $1\,^1/_3\,\mu$ Länge und etwa $^1/_3\,\mu$ Breite, dann längere Exemplare, Scheinfäden vielleicht von $10\,\mu$ Länge und derselben Breite wie die obigen. Wie bei anderen Species hin und wieder beobachtet worden ist, fällt auch hier die Anordnung der Kügelchen namentlich in den langen Formen auf. In der linken Hälfte der langen Stäbchen sind fünf gleichmässig abstehende, genau gleich grosse Kügelchen eingelagert, von da an nehmen nach dem rechten Ende hin dieselben an Grösse ab. Einzeln stehende kleine Stäbchen tragen oft an beiden Enden fast öfter aber nur an einem einzigen Pol ein blaues Kügelchen. Eine Prominenz der Körner über die seitlichen Contouren der Bacillen hinaus findet beim Typhusbacillus nicht statt.[2] Längere Stäbchen von 2 bis $3\,\mu$ Ausmaass, die drei bis vier Kügelchen bergen, sind einige Male gesehen worden. Es ist jedoch sehr wohl möglich, dass es sich in diesem Falle um Zwillings- oder Drillingsstäbchen handelt. Das Object ist jedoch zu klein, als dass zu entscheiden wäre, ob Septen oder Einschnü-

[1] Auf diesem Standpunkt steht auch C. Fränkel (*Grundriss*, S. 282), der das pro und contra scharf und klar hervorhebt.

[2] Birch-Hirschfeld (*Archiv für Hygiene*, 1887, Hft. 4) findet, dass in seinen gefärbten hängenden Tropfen die Dicke der Sporen den Durchmesser des Bacillus nicht selten übertreffe. Es ist dieser Widerspruch nicht der einzige, ja nicht einmal der wesentlichste Grund, der mich veranlasst, die von mir nachgewiesenen Dinge als nicht identisch mit Birch-Hirschfeld's Sporen aufzufassen, sondern als genetisch verschiedene Wesen.

rungen oder gar Unterbrechungen zwischen den Einzelindividuen beständen.[1]

Das hier und da in der Litteratur erwähnte Verhalten der muthmaasslichen Typhussporen, wonach sie bei Zwillingsstäbchen nur an den distalen Enden sitzen sollen, während die proximalen Pole frei seien, konnte an mehreren Exemplaren bestätigt werden. Jedoch scheint mir das kein constantes, namentlich aber kein diesem Bacillus ausschliesslich zukommendes Merkmal zu sein, auf welches sich etwa eine differentielle Diagnose stützen dürfte. Neben sporenhaltigen Stäbchen und Fädchen, die allerdings das Hauptcontingent ausmachen, sind sporenfreie genug im Gesichtsfeld. Nicht selten sind sie etwas intensiver braun gefärbt, ein Verhalten, das wir auch an anderen Species wahrgenommen haben. Dieselbe Cultur nun, welche die Fig. 16*a* veranlasst hatte, wurde 24 Stunden (19.—20./IV.) wiederum bei 37·5° gehalten und dann weitere 24 Stunden (20.—21./IV.) bei Zimmertemperatur. Darauf bietet sie ein Bild dar, das Fig. 16*b* möglichst getreu wiederzugeben sich bemüht. Bacilläre Structuren sind nicht gänzlich aus dem Gesichtsfeld verschwunden, wenn sie auch in der Zeichnung wegen ihrer arrodirten unregelmässigen Contouren füglich vernachlässigt sind. Ich glaube sie mit vollem Recht als Involutionsformen auffassen zu dürfen. Das einzige ausgeprägte Formelement ist nun aber ein Ding, das mit allen in Typhusbacillen-Culturen beobachteten Formationen verglichen durchaus einen neuen befremdenden Eindruck macht. Es sind rundliche und oblonge, circa $^2/_3$ μ im Durchmesser haltende, also die Dimensionen von Staphylokokken kaum erreichende Gebilde von stärkerem Lichtbrechungsvermögen, die in leicht gebräuntem Mantel einen feinen, aber intensiv gefärbten blauen Punkt bergen. Für die Beurtheilung dieser Dinge lege ich grossen Werth darauf, dass bei eingeschobenem Diaphragma die Körperchen durch bläulichleuchtenden Glanz sich von den herumliegenden, durch das Gesichtsfeld verstreuten involvirten Bacillen auf's schärfste abheben. Aus der gegebenen Schilderung erhellt, dass ich nicht im Mindesten an der Sporennatur der fraglichen Dinge zweifle und in der That glaube, zum ersten Male mit dieser Evidenz durch Farbencontraste die Sporen des Typhusbacillus demonstriren zu können. Einen Vorbehalt möchte ich freilich noch daran schliessen. Ich habe damit noch nicht gesagt, dass die Gebilde der Fig. 16*b* fertige Sporen seien, vielmehr hege ich die Vermuthung, es handle sich um ein letztes Vorläuferstadium, und zwar erstlich, weil

[1] Ich benütze auch diese Gelegenheit, von Neuem zu betonen, dass in dem Obigen selbstverständlich kein Widerspruch mit de Bary's Satze liegen soll: Eine Mutterzelle bildet immer nur eine Spore (*Vorlesungen über Bacterien*, S. 14).

die Reaction so prompt und intensiv ausschlägt, und zweitens, weil, was die Figur ebenfalls berücksichtigt, einzelne oblonge Glieder der Sippe zwei blaue Kernchen statt nur eines einzigen enthalten. Damit ist auch schon präjudicirt, dass ich die bräunliche Hülle nicht für ein fertig gebildetes Exosporium halte, sondern eher als Residuum der ehemaligen einbettenden Bacillensubstanz ansehe, eine Auffassung, die in mehr als einer Beobachtung und mehr als einer Figur unserer Tafeln Begründung findet. Ebenso möchte ich die blauschwarzen Pünktchen der Fig. 16 *a* nicht mit dem Namen Sporen bezeichnen, da ihr Verhalten der Reaction gegenüber sie als das kennzeichnet, was ich bisher im Verlauf dieser Mittheilungen immer vorsichtig mit dem nichts präjudicirenden Namen: „Körner, Kügelchen“ etc. bezeichnet habe und über dessen Auffassung unten Aufschlüsse zu geben sein werden.

Zudem glaube ich, dass die eben beschriebenen Körner nicht identisch mit jenen Dingen sind, die Gaffky als Sporen angesprochen, sondern eher den von Friedländer und Meyer[1] wahrgenommenen, farblosen Stellen entsprechen, die sich von den ersteren durch ihre Multiplicität, ihre unregelmässige Anordnung und ihre geringe, hinter der des Bacillus zurückstehende Breite unterscheiden.

Dieselbe Cultur, die in letzter Zeit nun ohne Unterbruch bei $37 \cdot 5^0$ gestanden hatte, zeigt den 2./V. (also 16 Tage nach der Aussaat) wunderhübsche und scharfe Bilder, die nicht reproducirt zu werden brauchen, da die Figg. 16 *a* und *b* sie gut wiedergeben. Sehr oft wiederholt sich das Bild von Stäbchen (Fig. 16 *a* links oben) mit drei ungemein scharfen Kügelchen, von denen die äusseren nicht am äussersten Ende des Stäbchens stehen, sondern noch von einem feinen peripherischen Saum überragt werden. Auch die Bilder der Halbfigur b werden wiederum angetroffen, daneben noch Detritusmasse. Einzelne längere Stäbchen (9—10 μ lang) — für Typhusbacillen schon eine ganz ansehnliche Länge — zeigen Bilder, die an Fig. 13, Taf. V (rechts unten) erinnern und die wohl als Theilungserscheinungen aufgefasst werden müssen. Wegen ihrer minutiösen Beschaffenheit sind ja diese Hemdenknopfformen nicht so klar, ich möchte sagen aufdringlich, wie in Fig. 13, erwecken aber einen durchaus analogen Eindruck.

Eine Eigenthümlichkeit hat noch der Typhusbacillus in seinem Verhalten der Farbenreaction gegenüber. Die Nachfärbung mit Bismarckbraun gelingt nicht so schön, d. h. nicht so rein; ein etwas unentschiedener, schmutzig grüner Farbenton bleibt dem Stäbchen zurück, was aber das

[1] *Untersuchungen über den Bacillus des Abdominaltyphus.* Inaug.-Dissertation. Berlin 1881.

scharfe Hervortreten der blauschwarzen Kügelchen nicht im Mindesten hindert, sondern höchstens der Eleganz der Farbenbilder Eintrag thut. Im Hinblick auf die an und für sich schwierigere Färbbarkeit der Typhusbacillen im Vergleich mit anderen ist die geringe Affinität zu dem von vornherein wenig intensiv färbenden Vesuvin wohl verständlich.

So scharf und unzweideutig die Farbenreaction aber auch gelingt, so hinfällig und wenig dauerhaft ist sie bei alledem. Solche Präparate können nur in Wasser[1] untersucht werden, aber auch da löscht einmaliges Eintrocknen das Farbenbild aus und Zuträufeln von Wasser vom Rande des Deckgläschens her bringt das Verlorene nicht wieder. Canadabalsam ist ganz und gar vom Uebel. Zwar schnell präparirt und sofort eingelegt, geben die Objecte noch deutliche Bilder, die Stäbchen werden aber durch die Eintrocknung und dadurch verursachte Schrumpfung so klein, dass das Bild vieles von seiner Klarheit einbüsst.

Bacillus der Mäusesepticämie.

Ueber die Sporenbildung des Bacillus der Mäusesepticämie sind wir nur oberflächlich orientirt. Es werden glänzende Körperchen in den Büchern[2] erwähnt, die man gemeiniglich als Sporen ansehe. Bei Flügge[3] fehlt eine Notiz in dieser Richtung, doch bemerkt er bei dem in morphologischer Beziehung so sehr verwandten Rothlaufbacillus, dass man unter gewissen Bedingungen „die Bildung kleiner Kügelchen beobachte, die vermuthlich Sporen darstellen, obwohl über deren Bildung und Auskeimung der Kleinheit der Objecte wegen bis jetzt keine genaueren Beobachtungen gemacht werden konnten“. Unter solchen Umständen musste es schon als ein Gewinn erscheinen, wenn es gelingen sollte, durch eine Doppelfärbung den eigenartigen Charakter der Kügelchen den Bacillen gegenüber darzuthun. Es war also angezeigt, den Bacillus der Mäusesepticämie in den Kreis der Untersuchungen zu ziehen. Bei positivem Ausschlag der Reaction war in dem feinen Object auch ein feines Kriterium für die Leistungsfähigkeit der Methode zu erwarten.

Der Bacillus der Mäusesepticämie giebt wie der Typhusbacillus schon am 19./IV. Bilder, die auf einen dereinstigen positiven Ausschlag der

[1] Bei dieser Gelegenheit sei betont, dass alle Präparate in Wasser untersucht, beschrieben und gezeichnet sind, dass vom Canadabalsam alle Präparate leiden, weil eben die nothwendig vorausgehende Eintrocknung die feinen Structuren entsetzlich verunstaltet. Dies bitte ich bei allfälliger Nachprüfung meiner Funde berücksichtigen zu wollen.

[2] C. Fränkel, *Grundriss.* S. 335. — Baumgarten, *Lehrbuch der pathol. Mykologie.* S. 479. — Eisenberg, *Tabellen.* S. 75.

[3] Flügge, *Die Mikroorganismen.* S. 246.

Reaction hoffen lassen. Zum Unterschied gegenüber dem Typhus hatte die Cultur der Mäusesepticämie die ganze Zeit (16. bis 19./IV.) im Brütschrank bei 37.5° zugebracht. Am 19./IV. sind zwar noch keine überzeugenden eindeutigen Bilder vorhanden, hier und da erscheint namentlich in längeren Fäden ein dunkleres Knöpfchen, doch sind solche im Präparat so spärlich, dass über ihr Wesen kaum etwas Bestimmtes ausgesagt werden kann. Schon am 21./IV., mehr aber noch am 23./IV. zeigen sich in steter Progression immer mehr Kügelchen und zwar so regelmässig angeordnet, von so gleichmässigem Korn und in so gleichen Abständen aneinander gereiht, dass wir geradezu die schönen Cyanogenusbilder Figg. 2, 5, 8 en miniature vor uns zu sehen meinen. Fig. 17*a*, Taf. V sucht die Bilder des 19./IV., Fig. 17*b* diejenigen des 21. bis 22./IV. wiederzugeben, mit dem nicht sehr in die Augen springenden Unterschiede beider, dass die Kügelchen des letzteren Bildes wohl etwas grösser und regelmässiger geworden und dass die längeren Fäden überwiegen, ohne dass wegen der Kleinheit der Objecte entschieden werden könnte, ob nicht die Fäden eben bloss Scheinfäden, das heisst in Einzelstäbchen septirt, seien. Aus diesem Grunde muss wiederum, wie schon einige Male im Laufe dieser Betrachtungen dahingestellt bleiben, ob die Ansicht de Bary's, dass je ein Stäbchen nur je eine einzige Spore trage, auch auf diesen speciellen Bacillus ausgedehnt werden dürfe. In den Culturen der letzten Tage sind, um noch einige Maasse anzugeben, Fäden von 20 bis 25 μ keine Seltenheit, während ich über die Dicke derselben aus einleuchtenden Gründen nichts auszusagen wage; sie ist unmessbar gering. Aus diesem selben Grunde muss ich das Ausmaass der Kügelchen unbestimmt lassen. Der Curiosität wegen aber will ich hier einschalten, dass diese Objecte zum Feinsten und Minutiösesten gehören, was mir in mikroskopischen Dingen vor die Augen gekommen ist, ja dass wir sie geradezu als Testobjecte benützt haben, als es sich darum handelte, eine apochromatische Immersionslinse von Zeiss zu prüfen und für das Institut zu erwerben. Eine solche erst hat mir denn auch die letzte Skepsis hinweggeräumt. Ich erwähne dies nur, um daran die Bitte zu knüpfen, an eine eventuelle Nachprüfung mit entsprechender Sorgfalt zu gehen.

Um aus den Zeichnungen kein Missverständniss erwachsen zu lassen, muss noch betont werden, dass sie keinen Anspruch darauf machen, das Verhältniss von sporenhaltigen und sporenfreien Fäden und Stäbchen zu veranschaulichen.

Es sind in beiden Fällen (*a* und *b*) der letzteren mehr als der ersteren. Mit Sporen ist nur eine gewisse Elite ausgerüstet. Dieses Verhaltens ist schon zu öfteren Malen gedacht in dieser und der früheren Mittheilung. Mit jedem Tag scheint denn auch die Sporulation immer mehr eine

Function der längeren Fäden zu werden, ähnlich wie bei Fluorescens und Cyanogenus. Die Zeichnung (Fig. 17) nimmt darauf keine besondere Rücksicht, ebensowenig auf ein schon mehrfach, so beim Typhusbacillus unter anderen erwähntes Verhalten. Wenn nämlich in langen Fäden das eine Ende die Kügelchen in regelmässigen und ziemlich gleichen Abständen enthält, so nehmen Intervalle und Dimensionen der Körner gegen das andere Ende hin ab (vgl. Fig. 16*a* und ferner Fig. 8, Taf. VI). Ob daraus schon der Schluss gezogen werden darf, dass der Process der Sporulation von einem Ende zum anderen schreitet, will ich dahin gestellt sein lassen; doch ist eine solche Vermuthung nicht ganz ohne Berechtigung. Zur Stütze der Interpretation genannter Kügelchen als Sporen muss übrigens auch bei diesem Bacillus erwähnt werden, dass trotz bestehender Blaufärbung ein eingeschobenes mittleres Diaphragma den Kügelchen einen hellen Glanz verleiht.

Versuche mit Heuaufgüssen.[1]

Streng nach Buchner's Vorschrift wird ein Heuinfus bereitet, mehrere Stunden im Brütschrank bei 37·5° gehalten, dann abgeschöpft,

[1] Ich sage absichtlich: Versuche mit Heuaufgüssen und nicht mit Bacillus subtilis, da ich mehrere Male die Erfahrung gemacht habe, dass mir die strenge Befolgung der Buchner'schen Vorschrift nicht eine Reincultur von Bacillus subtilis lieferte, sondern dass ein anderer Bacillus daneben noch sein Wesen trieb, der wegen seiner weitgehenden Aehnlichkeit mit Subtilis vielleicht hier und da Anlass zu Verwechselungen gegeben haben mag. Ich gebe trotzdem hier den Versuch mit dem Heuinfus wieder, weil mir die Figg. 11, 13, 14, Taf. V zum Nachweis der verschiedenen Wirkungen Neisser's und meiner Reaction sehr zu Statten kommen. Das Unreine des Versuches werde ich durch Zerlegen in die verschiedenen Componenten nachher ausmerzen. Dass ich übrigens mit dieser mitgetheilten Erfahrung nicht allein stehe, möchte ich mit einer Bemerkung de Bary's beweisen, die er (vgl. *Morphologie und Biologie der Pilze*, 1884, S. 525) bei Besprechung der Koch'schen Kritik der Buchner'schen Versuche anbringt: „Das primäre in die Untersuchung gezogene Material mag zwar gewiss bewusster Weise zum allergrössten Theil aus Bacillus subtilis bestanden haben; dass aber in einem Heuinfus nicht neben dieser Species auch andere, in der überwiegenden Menge des Subtilis zunächst zurücktretende und praktisch nicht unterscheidbare Bacillen enthalten sind, dafür ist keine Garantie vorhanden. Es wäre sonach wunderbar, wenn aus einem Materiale wie Heu nach einem bestimmten Recept immer nur der eine Bacillus subtilis rein, ohne Beimengung anderer gewonnen würde, zumal da die anscheinend besonders sichere Procedur des Receptes, das Erhitzen zum Sieden, keine sichere Garantie bietet, weil auch die Sporen anderer Bacterien als des Bacillus subtilis solche Erhitzung ertragen." — Ich will übrigens nicht unterlassen beizufügen, dass ich jüngst ein Heuinfus genau nach Buchner's Recept bereitet habe, das nach der Neutralisation genau 1 Stunde im Koch'schen Dampfcylinder mit Verwendung eines Bunsen'schen Brenners verweilt hatte, nachdem zuvor das Wasser bis zur vollen Dampfentwickelung



neutralisirt mit concentrirter Sodalösung und gegen zwei Stunden bei niedrig geschraubtem Brenner im Dampfapparat bei geringer Dampfentwickelung gekocht. Wiederum über Nacht bei 37·5° gehalten, zeigt sich die Oberfläche von einer Haut überzogen, der nun mittelst der Platinöse Proben entnommen werden. Dies ist das Material zu den nachfolgenden Präparaten (Figg. 11, 13, 14, Taf. V).

Vor allem fällt eine ausserordentliche Mannigfaltigkeit der Formen auf: Bacillen von wohlgebildeter schlanker Gestalt, zum grössten Theil 4 bis 6 μ, zum kleinsten bloss 2 bis 3 μ lang und etwa $^2/_3$ μ dick, bilden das Hauptcontingent. Mit äusserst geringen Ausnahmen sind die Stäbchen mit schwarzblauen Kügelchen armirt und zwar begnügen sich die wenigsten mit 1 bis 2 solcher Wesen; die meisten tragen ihrer mehrere (3 bis 4 bis 6) und es steht die Anzahl mit der Länge der sie beherbergenden Bacillen allerdings in einem geraden Verhältniss. Liegen ihrer zweie im Stäbchen, so kommt es wohl vor, dass sie zu äusserst an den Polen sitzen, doch oft genug liegen sie eine kleine, kaum messbare Strecke von denselben entfernt, oft sitzt das eine in der Mitte, das andere am Ende. Ihre Grösse ist recht verschieden, was sich aber erst bei 700- bis 800 facher Vergrösserung nachweisen lässt. Mit schwächeren Systemen gewinnt man ein so zierliches, regelmässiges Bild, das die hübschesten Figuren der Xerosisbacillen in den Schatten stellt. 9 bis 10 Kügelchen, oftmals in der Grösse alternirend, in längeren Faden sind keine Seltenheit. Um nun zum anderen Extrem überzugehen, so findet sich im Präparat eine ansehnliche Anzahl freier Sporen, deren Aussehen, Grösse und Gestalt ja gerade bei Subtilis allzu bekannt sind, als dass Täuschungen mit unterlaufen könnten. Gerade dieser Umstand machte es mir wünschenswerth, einen so wohlbekannten Organismus auf sein Verhalten der neuen Reaction gegenüber zu prüfen. Die Maasse der freien Sporen mögen $1^1/_3$ μ und $^2/_3$ μ betragen. Ein helles Azurblau ist ihre Farbe. Einzelne tragen einen etwas gesättigteren Farbenton, der aber immerhin den fast schwarzen Kügelchen gegenüber hell zu nennen ist. Diese dunkleren lassen ausnahmslos auch eine lichtblaue Hülle unterscheiden. Haben wir nun die beiden extremsten Elemente des Präparates betrachtet, Dinge, welche die Fig. 13 nicht nur nicht schematisirt, sondern in ihrer Prägnanz nicht

---

gebracht worden war. Nach dieser Behandlung erhielt ich allerdings eine Reincultur des Bacillus subtilis in 48 Stunden. Der Zweck dieser ganzen Anmerkung ist der, die Interessenten auf die Fehlerquellen bei der Bereitung von Heuinfusen aufmerksam zu machen und ihnen die Wege zu weisen, jene zu vermeiden. Um ganz sicher zu gehen, ist es wohl noch empfehlenswerther, dem Rathe Gruber's (*Centralbl. für Bacteriologie u. Parasitenk.*, Bd. III. Nr. 18) zu folgen und das Infus $2^1/_2$ Stunden fortgesetzt im strömenden Dampf zu lassen.

einmal exact genug wiedergeben kann, so haben wir es nun in dem Hauptcontingent der Erscheinungsformen mit unzähligen Uebergängen zwischen diesen zwei Stadien zu thun, die alle eine so hübsche ununterbrochene Reihe bilden, dass kein Glied der Kette fehlt und der ganze Formenkreis lückenlos uns ein Bild der Entwickelung entrollt. Den ersten Anfang macht eine leichte Anschwellung des Bacillenprotoplasmas um ein Kügelchen herum, gewöhnlich ein endständiges, und synchron damit wird das schwarzblau heller, d. h. deutlich blau. Drei solche Formen werden in Fig. 13 unschwer herauszufinden sein. Sie sind nicht willkürlich herausgefischt, sondern repräsentiren eine Unsumme von Ihresgleichen. In der nächsten Phase nimmt die Anschwellung noch etwas mehr zu. Vergleiche mit Kaulquappen oder Kochlöffeln und dergleichen liegen nahe. Hand in Hand damit differenzirt sich das blaue Korn in eigenthümlicher Weise. Es ist gewachsen mittlerweilen und lässt ein dunkelblaues Centrum und einen lichtblauen Mantel mit grosser Schärfe unterscheiden. In diesem Stadium sitzt nun in der Mehrzahl der Fälle ein schwarzes Korn an der Uebergangsstelle von angeschwollenem Theil in den Stiel, manchmal ganz dicht am einen Pol des grossen blauen Ovoids, zu welcher Form nun unterdessen die Kugel sich gedehnt hat. Am Ende des Stieles sitzt nicht selten noch ein zweites, aber winziges schwarzes Pünktchen. Dann sind sehr verwandte Formen noch da, die der Interpretation einige Verlegenheit bereiten, Kaulquappenformen mit dem in geschilderter Weise geschichteten blauen Inhalt, aber ohne schwarze Nebenkügelchen. Haben solche darin nie bestanden oder sind sie verschwunden? Ist also eine solche Form entstanden aus einem Stäbchen, das von vornherein überhaupt nur ein Pünktchen barg, oder sind die anderen verkümmert, nachdem ein bevorzugtes unter ihnen die Rolle des Stammhalters übernommen hat? Die letztere Vermuthung würde mit manchen Beobachtungen übereinstimmen. Ich habe in dem Aufsatz über den Xerosisbacillus schon auf diesen Uebereifer der Sporulation hingewiesen, der, wenn erst einmal das Bedürfniss gedeckt ist, wieder in ruhigere Bahnen gelenkt wird. Dass ich mich hierin mit manchen litterarischen Angaben im Einklang befinde, haben einschlägige Citate bewiesen.

Nun folgt eine Periode fortschreitender Aufhellung der blauen Ovale in den keulenförmigen Enden. Die Scheidung in Kern und Hülle verschwindet und eine homogene lichtblaue Farbe durchsetzt gleichmässig das Oval. Von da an scheint das bacilläre Anhängsel zu verkümmern. Wie Pflaumen am Stiel hängen die blauen Ellipsen an den rudimentären Bacillen und mit dem Abfallen dieses Stieles wird die Spore frei. Einzelne freie Sporen freilich — übrigens ist ihre Zahl beschränkt — sind noch in dunkleren Kern und hellere Hülle differenzirt, offenbar solche, deren

Reife die Verkümmerung der Bacillenrudimente vorausgeeilt ist, statt mit ihr gleichen Schritt zu halten, wie die Norm es erheischt.

Wird nun ein Deckglaspräparat mit siedender Methylenblaulösung behandelt oder die aufgeträufelte Farbe über der Bunsen'schen Flamme einige Male aufgekocht, so wird das Bild merklich anders. Von den kleinen schwarzen Kügelchen ist keine Spur mehr vorhanden. Alle Stadien der Entwickelung sind aus dem Bild ausgelöscht (Fig. 14) bis zur vollzogenen Differenzirung der blauen Ellipsen in Kern und Hülle. Diese färben sich auch jetzt in ähnlicher Weise, ebenso die geschwänzten und die freien Sporen und zwar eher intensiver als nach meiner Methode. Zum Vergleich gebe ich das Bild (Fig. 11), das durch Anwendung der Neisser'schen Reaction hervorgerufen wird. Es geht daraus hervor, dass im Stadium der Differenzirung einige Ovale schon rothe Kerne zeigen, andere nicht, dass im Stadium der geschwänzten und der freien Sporen die einen intensiv roth gefärbt sind, andere ganz farblos. Worin der Grund liegt, ist mir nicht ersichtlich; man müsste denn annehmen, dass von den überaus resistenten Sporen eben nur diejenigen von Farbstoff völlig geladen werden, die durch das kurze Aufkochen abgetödtet sind, was mit Buchner's Ansicht übereinstimmen würde.

Nachdem das Kölbchen mit dem Heuinfus drei bis vier Tage bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde wiederum ein Präparat untersucht. Das Auffallendste ist eine starke Zunahme freier, ovaler, lichtblauer Sporen. Das Wichtigste aber ist eine Form, welche eine schon längst postulirte Phase repräsentirt, die aber bisher immer noch eine Lücke in unserem Formenkreis gelassen hatte. Es sind Gestalten, die unserer Fig. 13 rechts unten angefügt sind, Stäbchen mit leichter knopfförmiger Anschwellung des einen Pols, niemals beider Enden. Darin sitzt ein winziges, schwarzes Pünktchen, manchmal etwas excentrisch; dann nimmt es zu an Grösse und verliert an intensiver Schwärze, gewinnt dafür an reinem Blau, bis wir die oben geschilderte Phase wieder erreicht und damit den Ring geschlossen haben.

So wichtig für Biologie und Morphologie der Fund eines neuen Formelementes in den Bacterien, der schwarzen Kügelchen nämlich, ist, so interessant der evidente Zusammenhang derselben mit der Sporenbildung sein mag, möchte ich doch den Schwerpunkt dieser Untersuchungen in den Nachweis verlegen, dass die schwarzen Punkte und Kügelchen oder wenigstens eine Elite derselben zu Sporen werden. Wie nun aber der Nachweis der schwarzen Kügelchen nur durch unsere Farbenreaction ermöglicht wurde, so ist der Beweis der erwähnten Metamorphose eben nur durch Untersuchung möglichst vieler Entwickelungsstufen, nur durch Demonstration eines ganz stetigen lückenlosen Formenkreises, von dem

jedes Glied an das vorhergehende anknüpft, zu erbringen und niemals durch die Beobachtung des lebenden Objectes, das uns durch Differenzen im Lichtbrechungsvermögen erst in fortgeschrittenere Stadien der Sporulation einweiht. Die meisten Erforscher der Sporenverhältnisse haben den letzteren Weg eingeschlagen, auf dem sie niemals zur Kenntniss unserer Prophasen (s. v. v.) gelangen konnten.

Aber nun taucht in demselben Präparat noch eine Erscheinung von grosser Verbreitung und grosser Constanz auf, eine Dehnung der Kügelchen nämlich zu oblongen schwarzen Ovalen, dann eine Furchung in der Mitte, die Bohnen-, Nieren- und Semmelformen zu Wege bringt, und endlich eine Theilung in zwei gleichgrosse Hemisphären.

Der Furchungsäquator steht senkrecht zur Längsaxe der Bacillen. Sind nun diese Furchungserscheinungen sowohl, als jene eben erst erwähnten knopfförmigen Anschwellungen mit winzigen centralen Pünktchen ihrer Natur und biologischen Stellung nach Dinge von höchst veränderlicher Beschaffenheit und kurzer, vielleicht nur momentaner Dauer, Durchgangsstationen, so zu sagen, so mussten sie sich naturgemäss nur unter Verhältnissen finden, die den ganzen Sporenbildungsprocess protrahiren. Die Hauptetappen, die mehr weniger stationären Typen, fanden sich damals schon, als das Heuinfus frisch dem Brütschrank entnommen, das Sporulationsgeschäft in flagranti zeigte. Je langsamer aber der Process von Stufe zu Stufe schreitet, um so mehr Uebergangsstufen wird man anzutreffen hoffen können. Der Vereinfachung der Tafel wegen sind nun diese Furchungskügelchen dem rechten Rande der Fig. 13 beigefügt, obschon sie also — ich betone es noch einmal — einem Heuinfus entstammen, das einige Zeit bei Zimmertemperatur gestanden hatte. Die gedehnten und die gefurchten Kügelchen kommen nun, wie übrigens auch die Abbildung lehrt, in Stäbchen mit und ohne Sporen vor. Ich glaube nicht, dass sie eine spätere Phase der Sporenbildung inauguriren, ich habe vielmehr den Eindruck, als ob es eine neben dem Sporengeschäft parallel einhergehende Erscheinung innerhalb des Kernlebens sei, eine Art „Kerntheilung“ etwa, die nur den Zweck hat, Kernsubstanz zu produciren, mehr Reservetruppen in's Treffen zu führen, die aber immer noch zur Disposition stehen und mit ihrer Entwickelung einstweilen noch hinter dem Berg halten können.

Dasselbe Präparat wird auch mit Nachfärbung in dünner Safraninlösung untersucht. Das Bild ist wegen des Farbencontrastes fast noch eleganter, jedoch vertreibt die Safraninlösung einen Theil, ja in den kleineren Kügelchen den grössten Theil des Blau, so dass dadurch das Studium derjenigen Phasen, an denen uns hauptsächlich gelegen ist, beeinträchtigt wird. Ich benütze wiederum die Gelegenheit, ausschliesslich

zur Anwendung dieser Reaction Bismarckbraun zu empfehlen und auf das Specifische dieser Farbencombination hinzuweisen.

Ich habe nichts dagegen einzuwenden, dass man die Methylenblau-Bismarckbraunfärbung eine Mischfärbung[1] im Gegensatz zur Doppelfärbung nenne, doch möchte ich damit nur den einen Theil der Wirkung bezeichnet wissen. Eben darum liegt mir ja so viel an der Fig. 13, weil sie aufdringlicher als alle anderen die Doppelseitigkeit der Methode demonstrirt. Alles dasjenige, was Jedermann heutzutage ächte Sporen nennen wird, färbt sich den braunen Stäbchen gegenüber rein blau: das ist ächte Doppelfärbung. Die Mischfärbung aber, die Addition von Methylenblau plus Bismarckbraun betrifft ein neues Element, das zur Sporenbildung in unleugbaren nahen Beziehungen steht, aber aus manchen Gründen nicht mit dem Namen „Sporen" belegt werden darf.

Ist ein Deckglaspräparat mit warmer Methylenblaulösung gefärbt und in Wasser abgespült und beträufeln wir es nun mit Bismarckbraunlösung, so geht bald von der Bacillenschicht eine schwarze Wolke aus, es ist die Methylenblauquote, die den Bacillen anhaftete und die nun durch das Braun substituirt wird. Die den Kügelchen innewohnende blaue Quote aber lässt sich nicht substituiren, sie lässt sich bloss von dem Braun noch superponiren, während den ächten Sporen gegenüber die braune Farbe sich vollends ohnmächtig erweist. Und eben darin suche ich den specifischen Chemismus dieser Reaction,[2] den ich zu erklären ausser Stande bin. Wiederum muss ich auf eine Erfüllung der Ehrlich'schen Forderung verzichten und kann höchstens die Aufmerksamkeit auf den Schwefelgehalt des Methylenblau richten, wodurch allein sich diese Farbe von den anderen in der Färbetechnik gebräuchlichen unterscheidet.

Der oben in der Anmerkung ausgesprochene Verdacht, es möchte sich in den Heuinfusen, die die Bilder 11, 13 und 14 geliefert haben, Subtilis nicht als Reincultur vorfinden, bestätigt sich durch Aussaat des Materiales auf Platten und Kartoffeln. Es wird von Subtilis auf diese Weise ein Bacillus gesondert, dessen Vegetationsformen auf der Kartoffel durch Fig. 15 wiedergegeben sind. Da er von allen untersuchten Species

[1] Neisser, a. a. O. S. 176.

[2] Um Missverständnissen vorzubeugen, muss ich übrigens bemerken, dass ich bezüglich der Combination dieser beiden Farben natürlich keine Priorität beanspruche. Methylenblau hat Buchner schon verwendet zur Sporenfärbung, auch habe ich die Combination mit Vesuvin von Huber angegeben gefunden (Huber-Becker, *Untersuchungsmethoden*, S. 30). Dagegen wird jeder Unbefangene einsehen, dass die ganze Art und Weise der Verwendung dieser Methode, ihre ganze Verfeinerung mit dem ursprünglichen Recept gar nichts zu thun hat. Zudem habe ich in meinem Aufsatze über Xerosisbacillen genügend hervorgehoben, welcher Art der Weg und die Schlüsse waren, die mich auf diese Methode geführt haben, unabhängig von den anderen.

die Kügelchen in weitaus reichlichster Menge enthält, zum Studium der Reaction also das dankbarste Object abgiebt, so werden mit ihm eine Reihe von gelegentlichen Experimenten gemacht, die hier episodisch eingeschaltet werden mögen.

Zunächst wird constatirt, dass absoluter Alkohol die Färbung nicht beeinträchtigt. Nachdem die Deckgläser einige Zeit darin gelegen hatten, sind die schwarzen Kügelchen kaum weniger zahlreich, kaum weniger scharf und präcise contourirt als zuvor, was übrigens auch für Fluorescens und Cyanogenus einmal beobachtet werden konnte. Jene oblongen, oft bohnenförmigen, schwarzen Tröpfchen kommen bei diesem Präparat besonders zur Geltung. Dass sie in der Mitte eine Verschmächtigung, gewissermassen einen Hilus zeigen und dass sie eher in längeren Individuen vorkommen, dürfte sie in Zusammenhang mit Theilungsphasen bringen lassen.

Ferner wird auch an diesem günstigen Object auf's Neue die Erfahrung bestätigt, wie sehr es auf den Grad der Erwärmung ankommt. Wird die Methylenblaulösung zum Kochen erhitzt, so ist der Effect ein ganz anderer, als nach Einwirkung sachte erwärmter, leicht rauchender Farbe. Was die Fig. 13 gegenüber 14 in Betreff des ganzen Infuses hervorkehren sollte, das wiederholt Fig. 19*b* gegenüber *a* speciell für unseren Pseudo-Subtilis. Im ersteren Falle, bei der Einwirkung kochender Lösung, kann man im ganzen Präparat von schwarzen Kügelchen oder grünblauen Figuren innerhalb der Bacillensubstanz nichts wahrnehmen. Nur da und dort, aber spärlich genug, liegt ein hellblaues ovoides Ding mit leicht braun gefärbter Hülle, offenbar eine freie Spore mit etwas anhängendem Bacillenprotoplasma. Nur heisser siedender Farblösung hat sich die Sporenmembran permeabel erwiesen (Fig. 19*a*). Anders nach leicht erwärmter Lösung. Die hellblauen Ovoide werden vermisst. Aber dafür treten da und dort Stäbchen auf, die bald ein oder zwei endständige, bald ein medianes, bald drei oder vier schwarze Kügelchen enthalten, die aber das Kaliber jener hellblauen Ovoide bei weitem nicht erreichen (Fig. 19*b*). Die erstere Figur erhalte ich auch nach der Neisser'schen Methode, nur mutatis mutandis, die zweite Figur nie und nimmer, auch wenn ich geflissentlich nur sachte erwärme und so meine Methode zu imitiren trachte. Dies ist wiederum ein Grund, warum ich die Differenz beider Methoden nicht gerne eine „graduelle“ nennen möchte, der mich im Gegentheil an der Auffassung einer specifisch chemischen Differenz festhalten lässt.

Wesen der sporogenen Körner.

Ich habe mich nun in den vorliegenden Blättern bemüht, ein möglichst grosses und vielseitig beobachtetes Material zu häufen, habe absicht-

lich vieles in der nüchternen Form von Protokollauszügen wiedergegeben, in dem Bestreben, alles subjective Deuten und Auslegen zu unterdrücken, die nackten Thatsachen allein reden zu lassen, damit aus dem Rohstoff unmittelbar jeder Unbefangene sich sein Urtheil bilde. Das alles hindert aber nicht, dass ich mich unablässig nach der Natur, nach dem eigentlichen Wesen des neu gefundenen Elementes gefragt habe, von dem man nun wohl den Eindruck gewonnen haben muss, dass es in seiner Genese vielfach denselben äusseren Bedingungen unterliegt, wie die Sporenbildung, dass es diese sehr oft einleitet, dass es gewissermassen den Keim der späteren Spore bildet, ohne aber den Anspruch erheben zu dürfen, selbst schon als Spore zu gelten.

Der Möglichkeiten sind nicht sehr viele. An Vacuolen ist gar nicht zu denken. Vacuolen färben sich nicht; Vacuolen kommen neben diesen Kügelchen oft genug vor, und sind von diesen immer mit Leichtigkeit unterschieden worden (vgl. Protokoll über Fluorescens und Cyanogenus). Dass die Kügelchen oft breiter werden als die Stäbchen, spricht ebenfalls dagegen. Dass das neue Element da und dort von irgend Jemandem schon gesehen worden, davon bin ich wohl überzeugt. Koch hat schon im Jahre 1876 in seinen „Untersuchungen über Bacterien“[1] auf Tafel XI Fig. 3*a* unregelmässig gelagerte und ungleichmässig grosse Kügelchen als Initialstadium der Sporulation abgebildet. Dies ist ein Beispiel statt vieler. Da aber das Erkennungszeichen meiner Kügelchen die erwähnte Farbenreaction einzig und allein ist, ist es mir unmöglich, den Identitätsnachweis zu erbringen. Zudem färben sich die Milzbrandsporen nach der Neisser'schen Methode schon in einem Stadium, da sie noch ganz klein und ganz unregelmässig gelagert, aber nach dem von mir angewandten Sprachgebrauch schon als Sporen aufzufassen sind. Ein Beispiel hierfür mag Fig. 15, Taf. VI, die freilich einem Präparat des Wurzelbacillus entnommen ist, liefern.

Sehr oft finden wir ferner Kügelchen erwähnt, die sich aus dem homogenen Protoplasma ausscheiden und die bald als Luftbläschen,[2] bald als „Eier“ und „Magenbläschen“ (Ehrenberg) angesprochen wurden. Es leuchtet ein, dass solche, zum Theil abenteuerlichen Vermuthungen einer entschwundenen Zeit heute kaum noch discussionsfähig sind. Es erscheint mir gar nicht unmöglich, dass jene Untersucher wirkliche Sporen vor sich gehabt haben. Cohn[3] erwähnt ölartige Kügelchen, die mitunter „erst beim Absterben sichtbar werden, wie dies auch

[1] Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit begründet auf die Entwickelungsgeschichte des Bac. anthracis. Cohn's *Beiträge.* Bd. II. S. 277.

[2] Hofmann, *Botan. Zeitung.* 1869.

[3] Untersuchung über Bacterien. *Beiträge zur Biologie.* Bd. I. Hft. 2.

sonst bei Pilzen vorkommt". Um dergleichen könnte es sich nun allerdings handeln. Das mit den Sporen synchrone Auftreten spräche nicht dagegen. Warum soll das Mykoproteïn, das mit dem Auftauchen der Sporen seine Rolle ausgespielt hat, nicht einer regressiven Metamorphose verfallen und warum nicht auf dem Wege einer fettigen Degeneration? Das wäre kein grösseres chemisches Räthsel als die fettige Degeneration thierischer Zellen. Aber dass auch diese Vermuthung nicht zutrifft, dass die Kügelchen nicht aus Fett bestehen, das beweist folgender Versuch:

Ein Deckglaspräparat mit körnchenreichem Pseudosubtilis wird, ohne dass es vorher durch die Flamme gezogen, nachdem die Bacillenschicht durch einfaches Antrocknen fixirt worden, etwa fünf Minuten mit kochendem Aether behandelt, ohne dass diese Procedur dem Resultat der Reaction Eintrag zu thun vermag. Die schwarzen Körnchen erscheinen kaum weniger exact und scharf begrenzt wie sonst; am ungefärbten Präparat freilich macht sich eine leichte Quellung der Bacillen geltend, so dass die Schärfe der Contouren etwas gelitten hat. Die Körnchen sind wohl wegen dieser gequollenen Umhüllung etwas undeutlich, gewinnen aber durch die Reaction urplötzlich ihre ursprüngliche Schärfe wieder.

Dass durch diesen Versuch den Körnern die Fettnatur genommen ist, bringt sie übrigens den Sporen wieder näher, deren Aufbau aus Fett nicht erst von Nencki und Dyrmont[1], wie neuerdings angegeben wird, sondern von Brefeld[2] schon im Jahre 1878 widerlegt wurde.

Dann habe ich an Stoffwechselproducte gedacht, welche durch die physiologische Thätigkeit der Organismen aus den Nährböden abgespalten werden. So wie die Beggiatoen aus sulfathaltigen Wässern (z. B. Schwefelthermen) Schwefel in feinstvertheiltem Zustande in ihrem Protoplasma abscheiden, der oft den optischen Eindruck stark lichtbrechender, hell glänzender Kügelchen machen kann, ebenso giebt es Amylum bildende Bacterien. Und merkwürdiger Weise ist es gerade von Prazmowsky's Clostridium butyricum (Amylobakter, Trécul.) und van Tieghem's Spirillum amyliferum bekannt, dass sie gerade in den der Sporenbildung vorangehenden Stadien Stärke bilden. Mit der Ausbildung der Sporen schwindet die Amylumsubstanz wieder. Was war nun begründeter als der Verdacht, es möchten meine Bacterien das Kartoffelamylum — mit Kartoffelculturen hatte ich es ja hauptsächlich, wenn auch nicht ausschliesslich, zu thun — in ihrem Protoplasmaleib deponirt haben.

---

[1] *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.* Bd. XXI.

[2] Sitzungsberichte der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin. Sitzung vom 19./II. 1878. *Botan. Zeitung.* 1878. Nr. 33.

Der folgende Versuch widerlegt auch diesen Verdacht:

Jodjodkaliumlösung in der Mischung, wie sie zur Gram'schen Methode angewandt wird, wirkt 10 Minuten auf ein Deckglaspräparat des Pseudosubtilis ein. Die Bacillen werden hellgelb, das Protoplasma erscheint leicht krümelig, die Kügelchen aber sind bei offenem Condensor fast gar nicht sichtbar, bei mittlerem Diaphragma je nach der Einstellung ölig glänzend oder tiefer beschattet als die Bacillen. Violette Klumpen und Fetzchen, die im Präparat herumliegen, rühren natürlich von Spuren der Kartoffeloberfläche her.

Vacuolen sind es also nicht, Fetttröpfchen und Amylumkörnchen haben wir abgethan, was bleibt nun noch übrig? Könnten es nicht Kerne sein? Kerne setzen aber Zellen voraus, setzen voraus, dass die Bacterien allgemein als einzellige Pflanzen aufgefasst werden. Darüber haben sich aber die Biologen durchaus noch nicht geeinigt, wovon ich mich selbst vielfach überzeugen konnte. Freilich, wenn de Bary[1] sagt: „Zellkerne sind in Bacterien bis jetzt nicht beobachtet", so schliesst dieses Wort die stillschweigende Voraussetzung ein, dass Bacterien Zellen seien und dass dereinst vielleicht es doch noch gelingen werde, Kerne nachzuweisen. Dagegen findet Klebs,[2] dass das Bacterienprotoplasma wegen seiner chromatophilen Eigenschaft „am ehesten mit der Kernsubstanz zu vergleichen sei". Man könnte daran denken, dass die ökonomische Natur das einfachste zellige Wesen nur mit dem Nothwendigsten, mit dem essentiellen Zellantheil, nämlich dem Kern, ausgestattet und sich den accessorischen Theil, das Protoplasma, gespart hat. Sonach wäre ein Bacillus ein nackter Kern, ein kurzes Chromatinfädchen. Damit würde dann auch die Auffassung chromatophiler Körner mancher Bacillen als Mikrosomen gut stimmen. Dass aber Klebs selbst an dieser Hypothese nicht festhält, beweisen seine Worte: „Spalt- und Fadenpilze müssten eigentlich als kernlose Pflanzen den höheren pflanzlichen Organismen, deren Zellen Kerne enthalten, gegenüber gestellt werden." Daraus klingt doch auch wieder die Hoffnung, es möchte der postulirte Kern für die einzellige Pflanze gefunden werden. Kurz, so ganz und gar aus der Luft gegriffen war der Gedanke an Kerne nicht. Es galt nun vor Allem, sichere Erkennungszeichen der Kernsubstanz ausfindig zu machen. Flemming[3] sagt nun in anderem Zusammenhang, bei der Besprechung der Frage, ob Chromatin auch im Kernsaft vorkomme: „Der Hauptgrund, weswegen sich ein ganz sicheres Urtheil in dieser Frage nicht fällen lässt,

[1] A. a. O.

[2] *Allgemeine Pathologie.* S. 76.

[3] *Zellsubstanz, Kern und Kerntheilung.* Leipzig 1882. S. 131.

ist der, dass wir für Chromatin, wie es der Name ja sagt, noch keine andere Reaction haben, als die ganz grob-empirische der Kernfärbung." Obgleich nun Flemming ursprünglich weder das Safranin noch auch das Hämatoxylin als reine Kernfärbemittel gelten lassen will, ersteres, weil es dem individuellen Ermessen anheim gestellt ist, wie viel von der ursprünglich überfärbenden Safraninquantität durch Alkohol wieder ausgezogen wird, letzteres, weil es auch Kernsaft, ja sogar Zellsubstanz leicht mitfärbe, so habe ich mich doch für Anwendung des Hämatoxylin entschieden.[1] Die Delafield'sche Vorschrift, die vom hiesigen Institut aus auch in weitere Kreise Eingang gefunden hat, liefert ein Tinctionsmittel, das den Anforderungen, welche an eine reine Kernfarbe gestellt werden, in hohem Maasse gerecht wird. Die Resultate dieser Versuche waren für mich geradezu verblüffend. Wer sich nicht die Mühe nimmt, diese Färbung nachzumachen, wird aus meinen Zeichnungen allein nur einen unvollkommenen Eindruck von der Exactität der Leistung gewinnen können. Um das Ergebniss gleich vorweg zu nehmen, will ich beifügen, dass, während diese Arbeit niedergeschrieben wurde, alle darin erwähnten Versuchsanordnungen wiederholt wurden und zwar mit vorwiegender Controle der Hämatoxylinfärbung, an die das erste Mal noch nicht gedacht worden war.

Die Resultate der von mir angegebenen Methylenblau-Bismarckbraun-Methode und der Hämatoxylinfärbung sind vollständig identisch.

Hämatoxylin färbt neben leiser Lilatinction der Bacillensubstanz alle jene Körnchen schwarzviolett, die durch die Methylenblau-Bismarckbraun-Methode blauschwarz werden.

Es ist unter dem grossen Materiale auch nicht ein einziges Präparat vorgekommen, das nicht die absolut identische Leistung der beiden Methoden auf's Eclatanteste bewiesen hätte. Wenn mich die Auffassung von der Kernnatur als vorgefasste Meinung von vornherein beherrscht hätte, dann würde ich planmässig zuerst nach dem Hämatoxylin gegriffen haben. Wie viel grösser und freudiger aber musste die Ueberraschung sein, als eine Vermuthung, auf die ich auf dem weiten Umwege der Exclusion als auf ein ultimum refugium schliesslich gerathen war, mit eins durch das sicherste Mittel unserer Zeit bestätigt wurde. Daneben hat die Hämatoxylinfärbung das unschätzbare Verdienst, auf's Klarste darzuthun, dass die von mir gewürdigten Körner, oder sagen wir nun „Kerne", ein Element sui generis sind, etwas von Sporen Verschiedenes;

[1] Flemming hat sich später wieder zu Gunsten des Hämatoxylin ausgesprochen.

denn niemals habe ich auch nur eine einzige Spore von Hämatoxylin gefärbt gefunden.

Das pro und contra dieser Auffassung will ich unten noch einmal gegen einander abwägen und für einmal noch einige erfahrungsmässige Daten einfügen:

Ein Heuinfus, das 48 Stunden im Brütschrank gestanden hatte, wird den 18./VI. untersucht. Es liefert ein genau der Fig. 13 entsprechendes Bild. Nach halbstündiger Färbung in Hämatoxylin zeigen sich da und dort an den Enden, gewöhnlich aber nur an dem einen Ende eines Bacillus ein durch seine schwarzviolette Färbung sich scharf vom Bacillus abhebendes Knöpfchen, immerhin zeigt ein Controlpräparat, nach der Methylenblaumethode gefärbt, deren scheinbar mehr. Fast scheint es. dass das dreimalige Passiren der Flamme der Färbung Abbruch thue, denn ein nicht erwärmtes Präparat färbt sich besser, namentlich aber dann, wenn das mit Hämatoxylin beträufelte Deckglas während der Färbung über dem Gasbrenner sachte erwärmt wird. Eine überaus prägnante Färbung wird aber erst dadurch erzielt, dass die ganze Nacht zu derselben verwendet wird. Am Morgen finde ich ein Präparat vor, in welchem kaum einem Bacillus ein endständiges, tiefviolettes Knöpfchen fehlt, eine Minderheit hat deren je zwei, und wo immer ganze Reihen von Stäbchen sich bilden, da stehen die Kügelchen an den gleichnamigen Polen (vgl. Fig. 12, Taf. V rechts oben). Ist man durch das Farbenbild genügend vorbereitet, so kann man die Kügelchen auch im ungefärbten Zustand ganz gut sehen. Mit apochromatischer Immersion 2 ^{mm}, Apertur 1·30 betrachtet, erscheinen sie ohne Diaphragma etwas schärfer contourirt und heller glänzend, mit mittelweitem Diaphragma dunkler beschattet als die Bacillen, bei einer genauen Einstellung als stärker lichtbrechende Körnchen. Erblicke ich nun schon in der charakteristischen Hämatoxylinfärbung eine mächtige Stütze für die Berechtigung, die schwarzen Körnchen als etwas Neues, Eigenartiges, als etwas von Sporen Verschiedenes und zwar geradezu als Kerne aufzufassen, so gewinnt diese Ansicht noch an Boden, wenn wir die im Präparat noch vorhandenen Sporen in's Auge fassen. Vollständig haben sie alles Hämatoxylin verschmäht und nur eine geringe Anzahl lässt einen ziemlich scharfen, violetten Contour erkennen. ohne Zweifel das sich bildende Exosporium, d. h. eine in Verdichtung begriffene Schicht des ehemaligen Bacterienprotoplasmas.

Dieselben Versuche wurden nun auch mit Reinculturen von Pseudosubtilis wiederholt und erweitert.

Eine Kartoffelcultur derselben vom 19./VI. wird nach kaum 24 stündigem Wachsthum bei 35 ° den 20./VI. untersucht. Das Präparat wimmelt von schwarzen Pünktchen und Körnern von allen Dimensionen, vom

winzigsten Punkt bis zum breiten Korn, das beiderseits die Contouren des Bacillus überragt. Die Bilder von Theilungserscheinungen wiederholen sich auch an der Reincultur auf's Schönste (Fig. 13 rechts unten). Neben diesen Doppelknopfformen erscheinen viele Zwillingsbacillen, die an den distalen Enden grössere schwarze Knöpfchen tragen, an den proximalen winzig kleine, manchmal nicht ganz runde, meniscusförmige. Ferner finden wir jene Kochlöffelformen der Fig. 13 wieder, die also dem Pseudosubtilis angehören. Zwischen dem Löffelstück, in dem die ungefärbte Spore sitzt, und dem Stiel sitzt jeweilen ein schwarzes Pünktchen. Es wird auch bei dieser Gelegenheit wiederum vergeblich versucht, mit Neisser's[1] Methode ähnliche Bilder zu erhalten, auch bei Zuhülfenahme gelinder Erwärmung. Bei starker Erhitzung färbt sich der Inhalt des Löffelstückes, wie in Fig. 11, als rothes, ovales Ding.

Am ungefärbten Präparat kann man die „Kerne" nach Anzahl und Anordnung, je nach der Einstellung an ihrem etwas stärkeren Lichtbrechungsvermögen oder an ihrer Beschattung erkennen. Es scheint mir, dass Zusatz eines Essigsäuretröpfchens an den Rand des Deckglases die Kerne deutlicher macht. Ferner zeigt sich, dass die erwähnten Zwillingsbacillen zusammenkleben, zahlreiche quirlende Bewegungen ausführen, ohne sich jemals zu trennen. Das Verhältniss der Grösse zwischen distalen und proximalen Körnchen könnte jedenfalls ohne Färbung niemals festgestellt werden. Ueberhaupt hoffe ich mit den hier niedergelegten Befunden die Ueberzeugung wachzurufen, dass jene alterthümliche Ansicht, es sei die Färbetechnik zwar ein angenehmer und gefälliger Zeitvertreib, habe aber dem gewiegten Mikroskopiker nichts wesentlich Neues erschlossen, endlich einmal definitiv aufgegeben werden darf.

Vorhergehende energische Essigsäurebehandlung hindert das Gelingen der Reaction nicht; nur habe ich den Eindruck, dass die allerfeinsten Tröpfchen weniger zahlreich erscheinen, dadurch also leiden.

Hämatoxylin in concentrirter Lösung, nur etwa fünf Minuten wirkend. färbt die Bacillen selbst fast gar nicht, die Körnchen intensiv schwarzviolett. Färbt man nun noch kurz mit Vesuvinlösung nach, so ist dadurch ein Bild entstanden, das kaum von dem Resultat meiner Methylenblau-Methode zu unterscheiden ist. Eigenthümlicher Weise färbt sich ein Präparat in sehr verdünnter Hämatoxylinlösung über Nacht nur schwach diffus, ohne alle Kerntinction, offenbar, weil die Bacillensubstanz allzusehr quillt, daher denn auch concentrirte Lösung nun keine Kernfärbung mehr zu Stande bringt.

---

[1] *Zeitschrift für Hygiene.* Bd. IV. S. 175.

Tuberkelbacillen.

Ob die neue Reaction oder aber die Hämatoxylinfärbung auch über die sogenannten Sporen der Tuberkelbacillen Aufschlüsse geben, war der Untersuchung werth, zumal da die üblichen Sporenfärbungen bei dieser Species nicht anwendbar sind; ist ja doch die jetzt allgemein angewandte Neisser'sche Reaction nichts anderes, als die Färbung der Tuberkelbacillen auf andere Bacillen übertragen.

Fig. 10 *a* zeigt Tuberkelbacillen, die in gelinder Wärme mit Löffler'scher Lösung gefärbt sind und nach Abspülung in Wasser auf schwacher wässriger Saffraninlösung etwa $1^1/_2$ Stunden geschwommen haben. Das Präparat entstammt einem Fall tuberkulöser, bronchiektatischer Cavernen und hätte, nach der Gabbet'schen (resp. B. Fränkel'schen) Methode gefärbt, jene varicöse Beschaffenheit der Bacillen gezeigt, die von vielen als für Sporenbildung charakteristisch angesehen wird, ohne dass es bis jetzt mit einiger Wahrscheinlichkeit gelungen wäre, die Sporennatur der fraglichen hellen Ampullen zu beweisen. Ein vergleichender Blick auf die verschieden behandelten Präparate lehrt, dass gerade dasjenige, was Gabbet's Methode ungefärbt lässt, in der That den blauen Farbstoff aufnimmt; es sind zwei bis drei Kügelchen im Bacillus. Das Object ist zu klein, um eine stricte Beweisführung zu erlauben. Nur wegen der Curiosität des positiven Erfolges und wegen der Analogie mit den Bildern des Xerosisbacillus habe ich die Ergebnisse des Tuberkelbacillus hier anfügen wollen. Aehnliche Bilder habe ich mit älteren Reinculturen auf Blutserum und Glycerin-Agar-Agar erzielt. Eine Cultur auf letztgenanntem Nährboden, die etwas über zwei Monate alt sein mag, wird den 28./VI. untersucht. Mit Methylenblau allein gefärbt, erscheinen ganze Reihen von Körnchen in einem Bacillus. Auch eine Nachfärbung in wässriger Fuchsinlösung ist statthaft, wenn sie nicht übertrieben wird, denn sonst werden die blauen Körnchen dadurch maskirt. Nur eine gewisse Auswahl der Stäbchen nimmt übrigens den allerdings spärlich gereichten Farbstoff an, aber es zeigt sich dabei, dass diese farbehungrigsten auch gerade die Körnerträger sind. Die ganz ungefärbten sind körnchenfrei. Was nun die Hämatoxylinfärbung anbelangt, so ersetzt ein Hinweis auf Fig. 10 *b* alle Beschreibungen. Die Wirkung ist frappant, mit der Methylenblaufärbung wiederum identisch; durch gelinde Erwärmung während der Färbung wird sie beschleunigt und verstärkt. Es würde sich demnach nicht sowohl um ausgebildete Sporen, als vielmehr um dasjenige handeln, was ich als „Kerne“ ansprechen möchte. Leider lässt sich die Hämatoxylinfärbung an Präparaten von Sputum oder Caverneninhalt nicht anwenden, weil

darin zu vielerlei zelliges Material und protoplasmatische Trümmer herumliegen, deren intensive Färbung ein verständliches Bild nicht zu Stande kommen lässt.

Eine vollständige Wiedergabe aller Erfahrungen, die mittelst der Hämatoxylinfärbung gemacht worden, wäre eine Wiederholung sämmtlicher oben mitgetheilten Protocolle über Bac. cyanogenus, fluorescens, den Wurzel- und Buttersäurebacillus. Ich kann die vollständige Identität beider Methoden verbürgen und mich somit nur noch auf einige kurze, abgerissene Notizen beschränken, die ausschliesslich zum besseren Verständniss der Abbildungen Erwähnung verdienen.

Bacillus fluorescens vom 19./VI. bis 2./VII. bei Zimmertemperatur auf Kartoffeln, hernach eine Nacht vom 2./VII. bis 3./VII. bei 36° gezüchtet, zeigt im Präparat kaulquappenartige Formen mit schwarzen hämatoxylingefärbten Körnern (Fig. 17, Taf. VI). In dieser Phase nach Neisser behandelt, färben sich keine Körner in den angeschwollenen Formen. Bacillus cyanogenus von demselben Alter und unter denselben Bedingungen gezüchtet und untersucht, zeigt ebenfalls schönste Hämatoxylinkörner.

Bacillus cyanogenus hat sich vom 19. bis 21./VI. bei Bruttemperatur gut entwickelt und zeigt beide Reactionen in prompter und identischer Weise. Neisser's Methode hingegen färbt ungemein spärliche, meist endständige Kügelchen, die zweifellos als Sporen gedeutet werden dürfen: die aber an Zahl so sehr gegen die anderen zurückstehen, dass darin allein schon die wesentliche Differenz zwischen Sporen und „Hämatoxylinkörnern" zu Tage tritt.

Der Wurzelbacillus hatte vom 19. bis 21./VI. im Brütschrank (36°) Formen gebildet, die, was die Reaction betrifft, genau der Fig. 3 entsprechen. Auch mit Hämatoxylin gelingt die Färbung vortrefflich und es zeigt sich dabei, dass die gelben, tropfenähnlichen Gebilde (Fig. 3) Hämatoxylin nicht annehmen.

Von den drei Proteus-Arten (Prot. mirabilis, Prot. vulgaris, und Prot. Zenkeri), die vom 23. bis 29./VI. bei Zimmertemperatur auf Kartoffeln wuchsen und vom 29./VI. bis 1./VII. bei 36°, zeigte nur der einzige Proteus vulgaris Hämatoxylin- und Methylenblaureaction.

Statt die vielen Versuche mit dem Milzbrandbacillus mit negativem Resultat anzuführen, die in meinem Protocoll figuriren, will ich nur den einen positiven melden, der durch die Fig. 16, Taf. VI fixirt ist: Im Brütschrank wuchsen auf Kartoffeln in 24 Stunden Bacillen, die in ihrem Verhalten dem Hämatoxylin gegenüber sich eng an den Wurzelbacillus (Fig. 13) anschliessen. Dasselbe Bild konnte nach zwei- und dreitägigem Verweilen im Brütschrank wiederholt constatirt werden.

Auch die Bilder des Typhusbacillus (Fig. 16, Taf. V) wurden durch die Hämatoxylinfärbung an Bouillonculturen auf's Neue bestätigt.

Bei Bacillus megaterium konnte in Bouillonculturen, die in einem constant temperirten Schrank von 20° C. aufbewahrt waren, zu öfteren Malen das Bild der Fig. 18, Taf. V gefunden werden.

Verdauungsversuche.

Trotz der oben citirten Bemerkung Flemming's, dass wir für Chromatin eben nur die grob-empirische Reaction der Kernfärbung besitzen, habe ich doch nach Argumenten ausgespäht, die meine Auffassung zu stützen vermöchten. Ich habe mich nun zunächst gefragt, ob wir es nicht mit einem Nucleïn zu thun haben, und habe mich dabei an Kühne's Lehre erinnert, dass von den geformten Bestandtheilen thierischer Gewebe nur das Nucleïn und die verhornten Massen der Epithelien (sowie das Neurokeratin) der Verdauung widerstehen. Freilich ist ja von vornherein eine Identifizirung von Chromatin und Nucleïn nicht zulässig, aber Zacharias hat auch dem Chromatin (dem tingibeln Bestandtheil des Kernes) eine Resistenz gegenüber der Verdauung zugeschrieben. Dass ich auf die Idee kam, Verdauungssäfte in ihrer Wirkung auf meine Körner zu prüfen, gründet sich aber namentlich auf Flemming's Satz:

„Es ist möglich, dass Chromatin geradezu identisch ist mit Nucleïnkörpern, jedenfalls geht aus den Versuchen von Zacharias hervor, dass es die Trägerin derselben ist und wenn nicht aus Nucleïn selbst, doch aus den Verbindungen besteht, aus denen dasselbe abgespalten wird."

Ein Präparat, das genau der Fig. 13, Taf. V entspricht und einem Heuinfus entstammt, schwimmt über Nacht auf künstlicher Verdauungslösung (Pepsin 0·5, Acid. mur. 0·2, Aqua 100·0). Morgens wird es in Wasser abgespült und der Reaction unterworfen. Alle bacillären Gebilde sind verschwunden, einzig die Sporen haben ihre Gestalt und ihr Färbungsvermögen beibehalten. Von schwarzen Kernen ist nichts zu sehen. Ein Präparat einer Reincultur des Pseudosubtilis, auf dieselbe Weise behandelt, führt zum selben Resultat. Schon nach dreistündiger Einwirkung des Verdauungssaftes gelingt die Hämatoxylinfärbung auch nach kräftigem Auswässern des Präparates nicht mehr. Die Vermuthung, es möchte der Salzsäuregehalt allein die Hämatoxylinfärbung hindern, bestätigt sich nicht, denn ein längeres Bad in Wasser, dem einige Tropfen Ammoniak zugefügt sind, giebt dem Präparat sein Färbungsvermögen nicht wieder. Obschon nun aber die Kügelchen keinen Farbstoff mehr aufnehmen und sich auch darin beiden Reactionen gegenüber ganz gleich verhalten, so sind sie durch ihren etwas stärkeren Glanz und schärferen Contour wohl noch zu

unterscheiden. Morphologisch sind sie noch nachzuweisen, wiewohl ihre chemische Zusammensetzung offenbar Veränderungen erlitten hat. Es handelt sich also wohl um einen Körper, der sich leichter peptonisiren lässt als das ächte Nucleïn. Diese Versuche haben darin wieder eine lehrreiche Seite, dass sie wiederum den essentiellen Unterschied zwischen Sporen und Kernen demonstriren. Die Sporenfärbung wird auch durch 24stündige Verdauung nicht im Geringsten behelligt. Eigenthümlicher Weise sind jene in Fig. 13 leicht wieder zu findenden Kochlöffelformen, die im angeschwollenen Ende dort einen dunkelblauen Kern innerhalb einer hellblauen Schale tragen, der Hämatoxylinfärbung noch zugänglich und zwar so, dass nur der centrale Punkt violett wird. Was heisst das anders, als dass die nackten Kerne allerdings von der Verdauung angegriffen, dass sie aber davor geschützt werden durch eine Schale verdichteten Protoplasmas, welche sich anschickt, wahrscheinlich ein Exosporium zu bilden. Dies letztere scheint nun allerdings permeabler zu sein für die alkalische Hämatoxylinlösung als für die saure Verdauungsflüssigkeit, was doch wieder recht an Ehrlich's Hypothese von der Tuberkelbacillenfärbung erinnert, die doch so manches Aehnliche mit der Sporenfärbung hat.

Zu einem lehrreichen Vergleich fordern die Figg. 13, 14, 15, Taf. VI auf, die alle ein und derselben zwei Tage alten Kartoffelcultur des Wurzelbacillus entnommen sind. Sie verdeutlichen besser als jede Beschreibung den Unterschied zwischen der Neisser'schen Reaction (Fig. 15) einer- und den beiden anderen (Figg. 13 und 14) andererseits und sie beweisen die vollkommen identische Wirkung des Hämatoxylins (Fig. 13) und der Methylenblaureaction (Fig. 14). Im Verein mit dem schon Gesagten sprechen die Bilder so überzeugend, dass eine weitere Erklärung an dieser Stelle füglich unterbleiben darf.

Versuche mit „Kernschwarz“.

Auf der Suche nach weiteren kernfärbenden Mitteln begegnete ich einer Notiz Platner's,[1] worin er dem „Kernschwarz“ die Eigenschaft nachrühmt, dass es nur Kerne, Kernkörperchen und Axencylinder färbe. Ohne Verzug machte ich nun auch dieses neue Reagens meinen Zwecken dienstbar und habe damit in der That günstige Erfahrungen gemacht. Kernschwarz färbt alles Dasjenige, was wir bislang als kernähnliche Dinge in Bacterien kennen gelernt haben, schwärzlich, die Bacillensubstanz selbst rauchgrau. Es resultiren keine eleganten Bilder, es ist ein eintöniges Grau in Grau. Aber trotz der matten faden Färbung ist die Differenz zwischen Bacillensubstanz und Kernen deutlich genug, um mit voll-

[1] *Zeitschrift für wissenschaftl. Mikrosk. und mikr. Technik.* Bd. IV. Hft. 3.



kommener Sicherheit die Identität dieser letzteren mit denjenigen nachzuweisen, die so eigenartig sich dem Methylenblau und dem Hämatoxylin gegenüber verhalten haben. Meine Versuche umfassen den Pseudosubtilis, den Fluorescens und Cyanogenus, also diejenigen, deren Kerne in so charakteristischer Weise aufgetreten sind, dass sie mit nichts anderem können verwechselt werden. Um die Kernschwarzbilder dieser drei Species zu schildern, müsste ich alles das wiederholen, was schon so ausführlich bei Fig. 13 für den Pseudosubtilis, bei den Figg. 2 bis 8, Taf. VI für Cyanogenus und den Figg. 3 bis 5, Taf. V für Fluorescens auseinandergesetzt ist. Nur darauf sei auch hier wieder mit Nachdruck hingewiesen, dass keine ächte Spore sich auch nur im mindesten mit Kernschwarz färbt. Platner führt an, dass die färbende Wirkung in einigen Minuten bis 24 Stunden vor sich gehe. Zur Färbung meiner Bacterienkerne bedarf es nun allerdings des Maximums dieser angegebenen Zeit. Erst nach 24 stündiger Färbung habe ich verständliche Bilder gesehen. Diese zögernde Wirkung erspart uns die Anwendung eines entfärbenden, beziehungsweise differenzirenden Bades, als welches von Platner Ammoniumhydrat empfohlen wird. Ueber die chemische Natur des Kernschwarz habe ich keine Aufschlüsse erhalten können; nur kann ich versichern, dass sie keine Anilinfarbe sei, was die wenig stürmische Wirkung auch erklärt, glaube vielmehr aus Geruch, Geschmack und Aussehen auf eine Tinte, wahrscheinlich irgend eine pflanzensaure Eisenverbindung schliessen zu dürfen. Daraus, dass Nebenkerne, die sich eben vom Hauptkern abgeschnürt haben, die Tinction mit Victoriablau und Safranin verlieren, und nur noch Hämatoxylin oder Kernschwarz annehmen, schliesst Platner, dass das Chromatin aus zwei Substanzen zusammengesetzt sei, deren eine im gewöhnlichen Sinne chromatophil sei, das heisst, namentlich zugänglich für Safranin und Victoriablau, die andere aber eine ausschliessliche Neigung zu Hämatoxylin und Kernschwarz besitze. Man wird sich hierbei erinnern, wie wenig Safranin bei meinen Kernen ausrichtete, und daher meine Muthmassung billig finden, es möchte sich vielleicht in unseren Kernen auch solch ein partielles Chromatin finden. Weiter auf die Hypothese einzugehen, halte ich zur Zeit für unstatthaft.

Oscillarien.

Von massgebendster Seite wurde ich auf das Interesse aufmerksam gemacht, welches eine Anwendung der neuen Reaction auf Oscillarien haben müsste, da einmal die Verwandtschaft dieser Algen mit den Bacteriaceen eine sehr nahe sei und zweitens Kerne bei jenen schon früher von Schmitz[1] gesehen worden sein sollen. Meine Orientirung in der

[1] Untersuchungen über die Structur des Protoplasmas und des Zellkerns bei Pflanzenzellen. *Sitzungsbericht der niederrh. Gesellschaft für Natur- u. Heilkunde.*

Litteratur bestätigte dies vollkommen. Auf die innige Verwandtschaft der beiden genannten Gruppen hat schon 1853 Cohn[1] hingewiesen. Zur weiteren Bekräftigung mag hier eine Stelle stehen, die ich in Leunis' Synopsis[2] finde: „Die Phykochromaceen", zu denen eben Oscillariceae, Chroococcaceae und Nostoceae u. s. w. gehören, „sind einzellige Algen mit einem homogenen, nicht mit Kernen versehenen und gleichmässig gefärbten Protoplasma. Meist ist dies ein blaugrüner Farbstoff, der ein Gemenge von Chlorophyll, Phykocyan und Phykoxanthin darstellt. Doch giebt es solche Algen auch von schmutzig-grüner oder bräunlicher Farbe, was wahrscheinlich von ungleicher Menge der Pigmente herrührt. Auch kommen Phykochromaceen von anderer, pfirsichblüthrother Farbe vor und bisweilen zugleich ohne Chlorophyll, so dass diese eigentlich zu den Schizomyceten gehören, welche überhaupt von den Phykochromaceen kaum zu trennen sind, da sie abgesehen von dem Mangel des Chlorophylls mit diesen, besonders in allen morphologischen Punkten, wie Zelltheilung und Bildung von Sporenzellen übereinstimmen und zwar so vollständig, dass für viele Phykochromaceen die morphologisch entsprechenden farblosen Formen unter den Schizomyceten zu finden sind." Dementsprechend fasst Leunis die Schizomyceten und die Phykochromaceen unter dem Namen Schizophyten zusammen. Wie man aus den Citaten sieht, ist die Annahme von Kernen bei Oscillarien oder Oscillatorien noch eine Tagesfrage und durchaus noch nicht zum Gemeingut Aller geworden. Dies zu meiner Rechtfertigung, ein Gebiet betreten zu haben, das nicht an meinem Wege liegt.

Zuerst ein Wort über das technische Vorgehen. Es konnte sich fragen, ob die ohne Zweifel succulenteren, wasserreicheren Fäden dieser Algen die Eintrocknung und Antrocknung an's Deckglas sich gefallen lassen werden, ohne Schaden an ihrer Structur zu nehmen. Deshalb habe ich verschiedene Wege eingeschlagen. Einmal kann man ein mit der Pincette gefasstes Flöckchen dem Deckglas antrocknen und in gewohnter Weise die übrigen Proceduren vornehmen. Am feinsten und gleichmässigsten wird die Schicht, wenn einem minimalen Spürchen, das auf die Mitte des Deckglases gelegt wird, Zeit und Gelegenheit gegeben ist, sich radiär über das ganze Deckgläschen zu verbreiten. Das ist in ein bis zwei Tagen geschehen und hat den Vortheil, die Fäden in der Anordnung ihres natürlichen Wachsthums zu fixiren. Dann habe ich eine Flocke auch wie einen Schnitt behandelt, habe sie in der erwärmten Methylenblaulösung und hernach in der kalten

Bonn 13. Juli 1880. — Untersuchungen über die Zellkerne der Thallophyten. *Ebenda.* 1879. 4. Aug.

[1] Untersuchungen über Bacterien I. *Beiträge z. Biologie d. Pflanz.* Bd. I. Hft. 2.

[2] Frank, *Leunis' Synopsis.* 1883. 3. Aufl.

Vesuvinlösung schwimmen lassen, in Wasser ausgespült und untersucht. Wenn ich einem Verfahren den Vorzug geben soll, so wäre es das spontane Wachsenlassen auf dem Deckglas und darauf folgende Fixation mittelst absoluten Alkohols. Denn diesen muss das Präparat auf alle Fälle passiren, damit ihm der Farbstoff entzogen werde. Ich habe anfangs ohne vorausgehende Extraction des Pigmentes die Färbung applicirt; immer ohne Erfolg. Sind aber nun alle oben erwähnten Cautelen berücksichtigt, so bekommt man das Bild der Fig. 18, Taf. VI. Ein solcher Oscillarienfaden setzt sich zusammen aus lauter gleichen, kurzen, scheibenförmigen Zellen, welche sich nur in der Richtung des Fadens theilen, wodurch die Verlängerung desselben bedingt wird. Ein Spitzenwachsthum, eine Astbildung kommen nicht vor. Ich habe die Breite eines solchen Fadens zu 6 bis $6^1/_2\,\mu$ gemessen, die Breite einer Einzelzelle, die Dimension also, welche der Längsrichtung des Fadens entspricht, beträgt $2^1/_2$ bis $4\,\mu$. Die Maasse sind nach Extraction des Farbstoffes in abs. Alkohol genommen, mögen daher im frischen, saftigen Faden grösser sein. Und nun zu den Kernen. Jedes eingeschaltete Kästchen, das einer Zelle entspricht, trägt im Innern eine Anzahl schwarzer, runder Körner eingebettet, die sich in allem der Reaction gegenüber so verhalten, wie unsere Bacterienkerne. Die Präparate mögen noch so lange in der Bismarckbraunlösung verweilen, niemals verblassen die schwarzen Körner. In der Regel liegen ein bis zwei grössere Tropfen in der Mitte, um die sich die anderen ordnungslos gruppiren, immerhin so, dass die feinsten Pünktchen peripherisch liegen. Wenn man also jedes Kästchen als eine Zelle auffasst, wie die Botaniker thun, so wäre der Kern ein Conglomerat von runden Tropfen einer chromatin-ähnlichen Substanz. Das Hämatoxylin nehmen diese Körner mit derselben Bereitwilligkeit auf, wie alle bisher geschilderten analogen Dinge der Bacterien. Schwimmt ein solches Oscillarienpräparat gegen 20 Stunden auf einer Verdauungslösung von obiger Zusammensetzung, so werden die meisten Kerne verdaut. Nur wenige Fäden gaben die Reaction noch, diese aber allerdings in schönster und deutlichster Weise. Ein Unterschied in der Formation der kernhaltigen und der kernlosen Fäden ist nicht wahrzunehmen. Hier haben wir also Tropfen einer dem Chromatin nahestehenden Zusammensetzung, die, so ähnlich den Bacterienkernen sie sich tinctoriell auch verhalten mag, der Verdauung gegenüber einen grösseren Widerstand an den Tag legt, sich dem Nucleïn also verwandter zeigt als jene.

Hält man nun diese resistenteren Oscillarienkerne, die neben verdaulichen Körnern bestehen, zusammen mit jenen Uebergangsformen zwischen sporogenen Kernen und Sporen beim Pseudosubtilis, die, wie wir gesehen haben, trotz Verdauung Hämatoxylin noch aufnehmen, weil sie mit einer



dichteren Protoplasmaschicht gegen den saueren Saft gepanzert sind, so wird man gegen die Deutung der Bacterienkörner und der Oscillarienkörner als analoge Dinge nicht viel einwenden können. Es sind nur unbedeutende graduelle Differenzen vorhanden.

Ganz ähnlich wie die Fäden der Oscillarien verhalten sich die Mycelien mancher Hyphomyceten, an denen ich die Reaction versuchte. Ich möchte mit dieser Bemerkung nur andeuten, wie weit und vielseitig die berührte Frage ist. Es ist dem Einzelnen nicht möglich, auf den ersten Anlauf Alles zu bewältigen. Nur um den Umfang des Gebietes, dessen Bearbeitung sich lohnen wird, abzuschätzen, sind hier und da die eng abgesteckten Grenzen des eigentlichen Themas überschritten worden.

Ich habe nun reiflich erwogen, was sich gegen meine Idee der Kerne etwa anmerken liesse, um nicht dem Vorwurf mich auszusetzen, eine Auffassung, deren Tragweite ich mir vollkommen bewusst bin, leichtfertig aufgegriffen zu haben.

Vor allem ist die heutige Zeit gewohnt, den Kern als integrirenden Bestandtheil der Zelle anzusehen, als ein Ding, von dem der Impuls zur Regeneration, zur Theilung und Vermehrung ausgeht, ohne den eine Zelle ein hinfälliges, kaum existenzberechtigtes Wesen ist, dessen Tod eine Frage der Zeit ist. Mit dieser Auffassung aber wollen unsere Erfahrungen am Bac. fluorescens gar nicht stimmen. Gerade unter den Bedingungen, die seine Productivität, seine Lebensenergie am meisten zum Ausdruck brachten, haben wir Kerne vermisst. Dagegen traten Kerne auf bei kümmerlichem Wachsthum und bei Sporenbildung. Abgesehen von diesem einen Beispiel haben wir doch bei jeder Species den der Kernbildung günstigen Bedingungen erst — und oft wie mühsam — nachgehen müssen. Wie verträgt sich das mit der postulirten Ubiquität des Kernes?

Diese ganze Frage ist verfrüht und das zeigt sich schon an der Leichtigkeit, mit der man ihr entgegnen oder vielmehr ausweichen kann.

Diese Methoden, die nun im gegenwärtigen Momente die feinsten Details im Bacillus zu erschliessen scheinen, sind ja möglicherweise viel zu roh und unbeholfen, um uns den Kern in jedem Bacillus, den Kern im Ruhezustand sichtbar zu machen. Erst in der Phase, da er aus diesem Latenzstadium heraustritt, um activen Antheil an der Fortpflanzung zu nehmen auf Kosten seiner alten Kernexistenz, wird er unseren Färbemitteln zugänglich, gerade so wie mitotische Figuren ohne alle schonende Vorbereitung in jedem Alkoholpräparat durch ihre stärkere Farbstoffaufnahme auffallen. Diese Hypothese hängt durchaus nicht in der Luft. Ich habe so oft auf das vergängliche ephemere Dasein unserer Kerne

hingewiesen. Es ist eben nicht der latente Kern, sondern ein nach der Species und nach den Versuchsbedingungen wechselnd grosses Stück, ein herausgeschnittenes Segment des Kernlebens, das wir haben ertappen können. Andere Methoden werden andere Segmente kennen lehren. — Dass übrigens in einer grossen Gemeinschaft organischer Wesen nur ein Theil mit sichtbaren Kernen ausgestattet ist, ist kein biologisches Unding. Darüber hat mich meine litterarische Orientirung längst beruhigt.[1]

Dann könnte es vielleicht manchen befremden, dass das Chromatin oder sagen wir allgemein die Kernsubstanz bei Bacterien und niederen Algen nicht wie sonst meistens in Form von netz- oder gerüstförmigen Structuren auftritt, sondern in Gestalt zusammenhangsloser Körner oder Tropfen. Doch diesem Vorkommen begegnen wir in der Zellenlehre nicht selten und dass diese Thatsache den Botanikern noch viel geläufiger ist als den Kennern thierischer Zellen, ersieht man aus Strassburger's[2] und Flemming's[3] Werken auf Schritt und Tritt. Zudem gesteht Flemming ausdrücklich und zu öfteren Malen, dass für ihn Chromatin mehr ein chemischer als ein morphologischer Begriff sei. Uebrigens ist die endgiltige Entscheidung auch dieser Frage zur Zeit noch nicht möglich, weil man ja die Hinterthüre offen hat, anzunehmen, dass vollkommenere Hilfsmittel in den Körnern noch allerlei minutiöse Structuren aufschliessen werden.

Ueber einen Hauptpunkt habe ich noch Rechenschaft abzulegen. Inwieweit ich mit der Ansicht, dass Kerne Vorläufer von Sporen seien, dass letztere aus ersteren direct hervorgehen, Fühlung habe mit botanischen Anschauungen, das wusste ich allerdings anfänglich nicht. Es zeigte sich aber bei näherer Orientirung, dass auch diese Metamorphose zum Gemeingut des botanischen Wissens gehört. Wer sich die Mühe nehmen will, Luerssen's Capitel[4] über die Ascomyceten und die de Bary entnommene Abbildung von Peziza confluens, oder die Zeichnung von Peziza convexula in Leunis' Synopsis[5] zu studiren, der wird erstaunt sein über die Analogie dieser Vorgänge bei Ascomyceten und Schizomyceten. Meine Genugthuung über diese Uebereinstimmung war um so grösser, da ich die Autori-

[1] So wüsste ich auch Einem, der sich ängstlich an den Satz „omnis nucleus a nucleo“ anklammerte und nicht fassen wollte, wie die Kernchen aus kernfreiem Plasma frei entstehen sollten, nur zu entgegnen, dass es ihm unbenommen bliebe, auch im scheinbar kernfreien Bacillus ein präexistentes Kernprincip anzunehmen, das sich eben unseren Hülfsmitteln noch entzieht.

[2] *Zellbildung und Zelltheilung.*

[3] *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.* S. 189. Discussion dieser Frage; überdies an vielen anderen Stellen dieses Buches.

[4] *Grundzüge der Botanik.* 1879. 2. Aufl. S. 203.

[5] Frank, *Leunis' Synopsis.* 1883. 3. Aufl. Fig. 561.

täten für meine Ansicht erst kennen lernte, als diese an ganz anderem Material, auf ganz anderem Wege sich schon fest gebildet hatte. Es sammeln sich in den erwähnten Schläuchen tropfenähnliche Gebilde, die sich theilen und vermehren, die dann in Centrum und peripherischen Ring sich differenziren und aus denen endlich durch Verdichtung einer Aussenschicht unmittelbar die Sporen hervorgehen. Ein Blick auf die citirten Bilder belehrt eindringlicher als alle Beschreibung.

Ich wünschte, den Eindruck erweckt zu haben, dass meinen objectiven Befunden nirgends Gewalt angethan ist, sondern dass alles hier Vorgebrachte eine auf die Bacteriologie übertragene Anwendung allgemein anerkannter, fest begründeter, biologischer und morphologischer Gesetze sei, dass auch das wenige Hypothetische überall auf dem Boden des heutigen litterarischen Gemeingutes stehe.

Folgende Sätze mögen in conciser Form das Ergebniss der mitgetheilten Untersuchungen zusammenfassen:

Drei von einander ganz verschiedene Methoden haben in einer Anzahl von Bacterien ein neues Element nachgewiesen.

Dasselbe färbt sich blauschwarz nach Einwirkung warmer (nicht heisser!) alkalischer Methylenblau- und kalter Bismarckbraunlösung („Mischfärbung").

Es färbt sich schwarzviolett mit Delafield'schem Hämatoxylin.

Es färbt sich schwärzlich mit Platner's „Kernschwarz".

Es ist bei einigen Bacterien gelungen, den directen Uebergang dieser Körner in Sporen nachzuweisen (Figg. 12 u. 13, Taf. V), und deshalb dafür der nichts präjudicirende Name „Sporogene Körner" vorgeschlagen worden.

Es konnte einige Male bewiesen werden, dass dieselben sich nach Neisser's Sporenfärbung nicht tingiren (Figg. 11, 14 gegenüber Fig. 13, Taf. V, und Fig. 15 gegenüber Figg. 13 und 14, Taf. VI).

Sie sind als ein von Sporen wesentlich verschiedenes Ding sui generis (wenn auch als deren Vorläufer) angesprochen worden, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Hämatoxylin färbt sie intensiv, färbt dagegen niemals eine Spore.

2. Dasselbe gilt von Platner's Kernschwarz, nur dass dieses die intensive Tinction des Hämatoxylin lange nicht erreicht.

3. In den Vorstadien (Prophasen) lassen sie sich leicht peptonisiren (in drei Stunden in einer Lösung von Pepsin 0·5, Acid. muriat. 0·2, Aqua 100·0), kommen dann in ein Stadium grösserer Resistenz gegenüber der Verdauung. Die fertige Spore ist unverdaulich.

4. Mit Methylenblau-Bismarckbraun färben sich die sporogenen Körner schwarzblau (Mischfärbung), die fertigen endogenen Sporen hellblau (Doppelfärbung) (Figg. 12, 13, 19, Taf. V; 3 und 12 gegenüber 9, Taf. VI).

5. Sie färben sich nicht nach Neisser, verschwinden urplötzlich in allen siedenden Flüssigkeiten und wenn es auch nur reines Wasser ist.

Die Körner sind sicher keine Vacuolen, bestehen nicht aus Fett (unlöslich in kochendem Aether), auch nicht aus Amylum (nicht färbbar mit Jodjodkalium).

Der gemachte Vorschlag, ihnen die Natur von Zellkernen zuzuerkennen, stützt sich auf folgende Gründe:

1. Hämatoxylin- und Kernschwarzfärbung.

2. Relativer Widerstand gegen Verdauung (namentlich in den späteren Uebergangsstadien).

3. Theilungserscheinungen (Figg. 5, 8, Taf. VI; 13, 16, Taf. V).

4. Fähigkeit, selbst zu Sporen zu werden. (Verbreitetes biologisches Princip, namentlich bei Ascomyceten.)

5. Vorkommen derselben bei Oscillarien, bei denen sie sich auch weniger leicht peptonisiren lassen.

Die empfohlene Methylenblaureaction hat auch bei Mikrokokken, Sarcinen und Hyphomyceten positive Resultate geliefert, ohne dass diese Befunde in dieser Arbeit näher verfolgt wären.

Es ist möglich, dass manches, was unter dem Namen Coccothrix geht, sich bei Anwendung obiger Methoden als kernhaltige Bacterien erweist.

Die empfohlenen Methoden, wobei namentlich an das in der Bacteriologie verschollene Hämatoxylin erinnert wird, werden zweifellos der Systematik neue Merkmale und Unterscheidungszeichen an die Hand geben. Zugleich ist dem Hämatoxylin, das gänzlich aus dem Arsenal der Färbetechnik im Gebiete der Bacteriologie verschwunden ist, wieder eine neue und gewichtige Rolle zugewiesen.

Heidelberg, 1. September 1888.

Erklärung der Abbildungen.

(Tafel V.)

Fig. 1. Bacillus fluorescens. 6 tägige Gelatinecultur. Keine Kerne.

Fig. 2. Bacillus fluorescens. Kartoffelcultur, wenige Tage alt (Zimmertemp.). Erster Beginn der Kernbildung.

Fig. 3. Bacillus fluorescens. Kartoffelcultur, einige Tage Zimmertemperatur, dann 24 Std. Brütschrank. Rege Kernbildung (Differenzirung der caryogenen Substanz).

Fig. 4. Bacillus fluorescens. 2×24 Stunden im Brütschrank, Kartoffelcultur. Excessives Wachsthum der kernbildenden Exemplare. Regressive Metamorphose (Vacuolisirung) der übrigen.

Fig. 5. Bacillus fluorescens. 3×24 Stunden im Brütschrank, Kartoffelcultur Fortsetzung von Fig. 4. Die Kerne werden gleichmässiger in Grösse und Gestalt.

Fig. 6. Bacillus butyricus. Ein Monat auf Kartoffel. Ausgebildete Sporen, färben sich nach der Methylenblau-Bismarckbraun-Methode hellblau (Doppelfärbung) und nicht wie die Kerne schwarz („Mischfärbung"). Keine Kerne.

Fig. 7. Bacillus cyanogenus. Ein Monat bei Zimmertemperatur auf Kartoffel. Sporen nach obiger Methode hellblau und endständig. Keine Kerne.

Fig. 8. Bacillus butyricus. 5 × 24 Stunden im Brütschrank auf Kartoffeln, dann 24 Stunden bei 30°. Kerne in Bacillen (schwarze Punkte), Uebergangsstadien zu Sporen (Kerne mit verdichteten Protoplasmahüllen) und freie Sporen.

Fig. 9. Bacillus fluorescens entspricht dem Stadium nach Fig. 5, mit Safranin nachgefärbt, fortschreitende Vacuolisirung.

Fig. 10. Bacillus tuberculosis. Alte Glycerin-Agar-Agar-Cultur. *a* Warme Methylenblaulösung und Nachfärbung mit Safranin. *b* Hämatoxylineffect.

Fig. 11. Heuinfus (meist aus Pseudosubtilis bestehend.) Nach Neisser's Methode gefärbt. Nur fertige Sporen und sporogene Körner mit verdichteten Protoplasmahüllen färben sich roth.

Fig. 12. Bacillus mycoides (wurzelförmiger) auf Kartoffeln. Kerne (schwarze Punkte in gelblichen ovalen Gebilden). Wachsen der Kerne und parallel damit Abblassen des Schwarz in Blau. Dünnerwerden des gelblichen Randes. Wachsen des Kerns zur Spore (hellblau). Deutliche Differenz zwischen Kern und Spore.

Fig. 13. Heuinfus (meist Pseudosubtilis). Deutliche Differenz zwischen Kernen (schwarz) und Spore (blau). Dasselbe Präparat wie Figg. 11 u. 14, nur mit gelinde erwärmter Methylenblaulösung gefärbt, soll den anderen Figuren gegenüber den Unterschied der neu empfohlenen Methode gegenüber Neisser's Methode demonstriren. (Rechts unten Theilungsfiguren.)

Fig. 14. Dasselbe Präparat wie Figg. 11 u. 13 mit kochender Methylenblaulösung gefärbt. Nur Sporenfärbung wie Fig. 11, keine Kernfärbung wie Fig. 13.

Fig. 15. Reincultur des Pseudosubtilis, das hauptsächlich Figg. 11, 13, 14 veranlasst hatte. Dehnung der Kernsubstanz, Vorbereitung zur Theilung.

Fig. 16. Bacillus typh. abdom. *a* Bouilloncultur. 2 × 24 Stunden bei Brüttemperatur und 1 × 24 Std. bei Zimmertemperatur. Kerne in den Bacillen. *b* Stadium des Uebergangs von Kernen in die Sporen (noch nicht reife Sporen), längere Zeit in Bouillon bei Brüttemperatur.

Fig. 17. Bacillus murisepticus. Bouillonculturen im Brütschrank. *a* 3. Tag. *b* 5. Tag.

Fig. 18. Bacillus megaterium. Bouilloncultur bei 20° C. im Thermostaten. Kernstadium, noch keine Sporen.

Fig. 19. Bacillus pseudosubtilis. *a* Wirkung erhitzter Methylenblaufärbung: Sporen werden gefärbt, Kerne zerstört. *b* Wirkung gelinde erwärmter Methylenblaulösung: Kernfärbung.

Fig. 20. Sogenannter Bacillus xerosis. 48 Stunden alte Hydrocelenserum-Cultur (37·5°) mit Hämatoxylin gefärbt (1/2 Stunde). Kernstadium.

(Tafel VI.)

Fig. 1. Wurzelbacillus. 2 × 24 Stunden im Brütschrank auf Kartoffeln. Kerne im Anfangsstadium. Schlankere, dünnere Bacillen als bei Zimmertemperatur.

Fig. 2. Bacillus cyanogenus. 2 × 24 Stunden im Brütschrank auf Kartoffeln. Excessives Wachsthum; Kerne in allen Grössen.

Fig. 3. Wurzelbacillus. 2 × 24 Stunden bei Zimmertemperatur auf Kartoffeln. Kerne (schwarze Punkte) in gelblichen Tropfen.

Fig. 4. Wurzelbacillus. 3 × 24 Std. bei Brüttemperatur auf Kartoffeln. Kerne in gelblichen Tropfen. Protrahirtere Kernbildung als bei Zimmertemperatur.

Fig. 5. Bacillus cyanogenus. 3 × 24 Stunden bei Brüttemperatur. Kerne werden grösser und gleichmässiger. Einige beginnen sich zu entfärben.

Fig. 6. Wurzelbacillus, 3 × 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Wachsen der Kerne und Blauwerden. Uebergangsstadium zwischen Kern (Fig. 3) und Spore (Fig. 9).

Fig. 7. Wurzelbacillus. 7 × 24 Stunden im Brütschrank. Grösserwerden der alten Kerne und junger Nachschub frischer Kerne.

Fig. 8. Bacillus cyanogenus. 4 × 24 Stunden bei Brüttemperatur. Zunehmende Entfärbung der Kerne; in diesem Stadium färben sie sich nach Neisser, werden somit Sporen.

Fig. 9. Wurzelbacillus. 4 × 24 Std. bei Zimmertemperatur. Kerne verschwunden (keine Mischfärbung mehr), nur noch Sporen (Doppelfärbung). Fortsetzung von Figg. 6 und 3.

Fig. 10. Bacillus cyanogenus im Stadium der Fig. 11. Erstes Gelingen der Neisser'schen Reaction. Was in Fig. 11 sich zu entfärben beginnt, wird in Fig. 10 roth.

Fig. 11. Bacillus cyanogenus. 5×24 Stunden im Brütschrank. Ende des Kernstadiums; Anfang des Sporenstadiums. Entfärbung der blau-schwarzen Kugeln („sporogenen" Körner).

Fig. 12. Wurzelbacillus. 4 × 24 Stunden bei 30°. Protrahirte Kernentwickelung. Zwischenstadium zwischen Figg. 3 und 6.

Fig. 13. Wurzelbacillus. Zwei Tage Zimmertemperatur. Dasselbe Präparat wie Figg. 14 und 15. Hämatoxylin-Effect: Schwarze Kerne in ungefärbten Ellipsen.

Fig. 14. Dasselbe Präparat wie 13 und 15. Nach der neu empfohlenen Methylenblau-Bismarckbraun-Methode. Derselbe Effect wie Hämatoxylin.

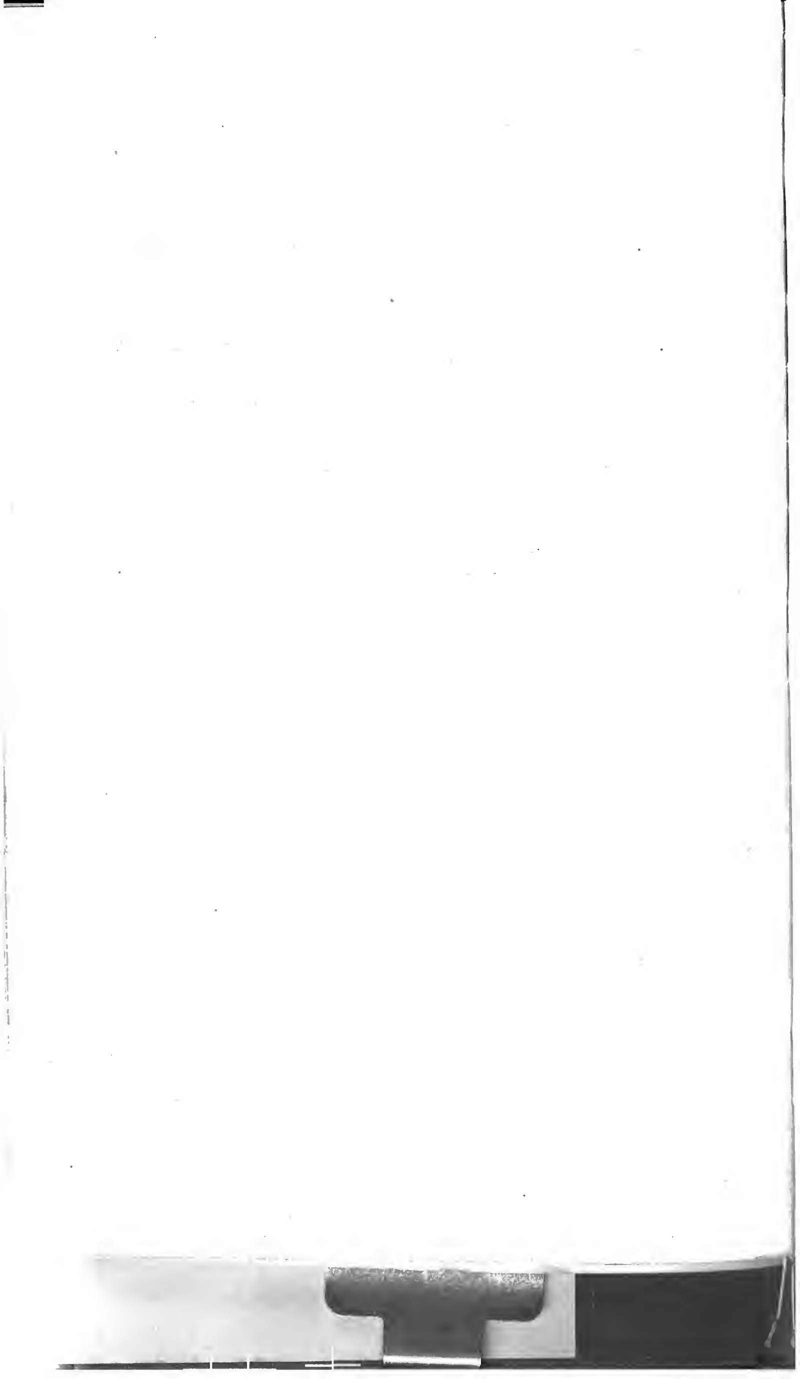
Fig. 15. Dasselbe Präparat wie 13 u. 14. Nach Neisser gefärbt. Die ganzen Ellipsen, die bei 13 und 14 ungefärbt bleiben, färben sich hier roth als Sporen.

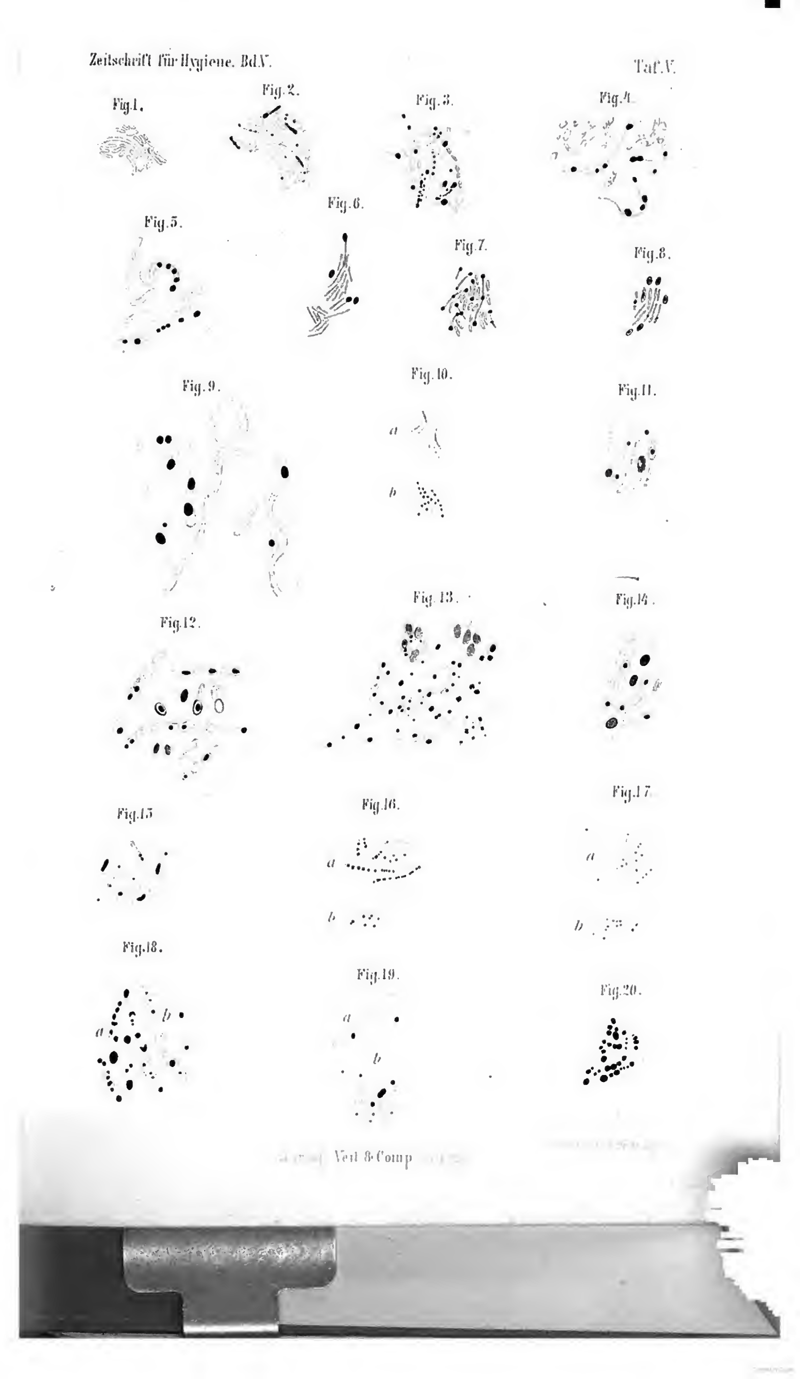
Figg. 13, 14, 15, demonstriren den Unterschied der Hämatoxylin-, der Methylenblau-Vesuvin- und der Neisser'schen Färbung an ein und demselben Präparate.

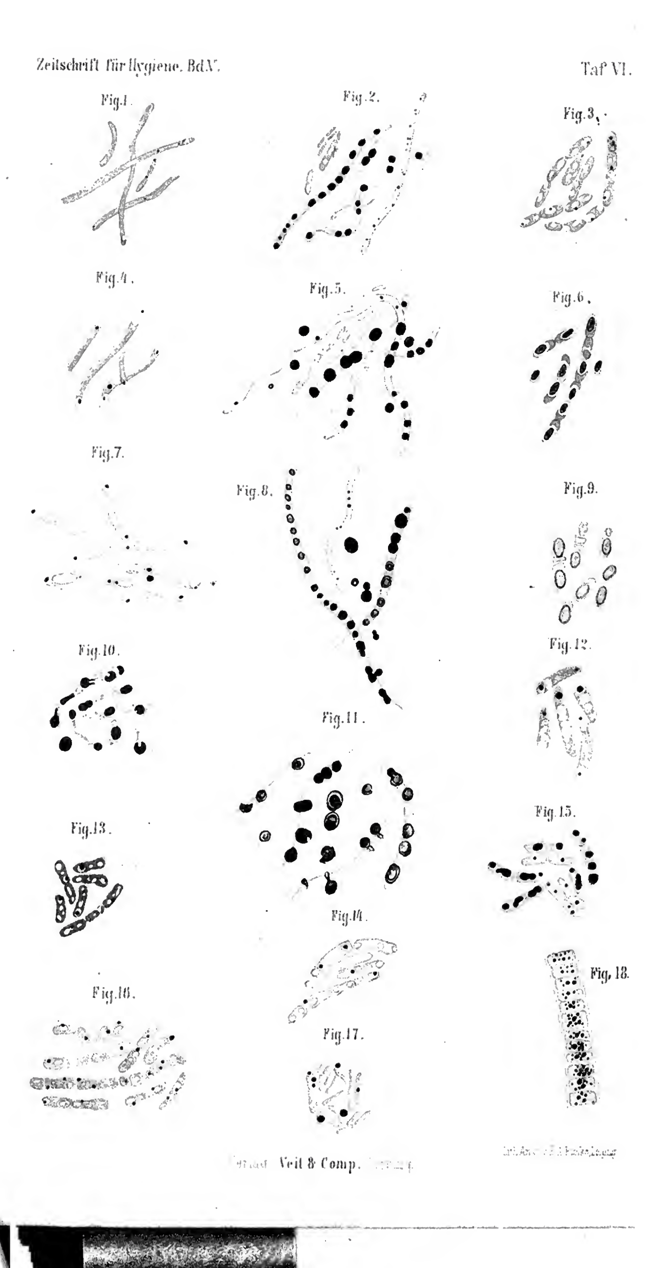
Fig. 16. Bacillus anthracis. 24 Stunden im Brütschrank auf Kartoffeln. Hämatoxylinfärbung. Kerne zum Theil in werdenden Sporen.

Fig. 17. Bacillus fluorescens. 14 Tage bei Zimmertemperatur, dann 24 Stunden im Brütschrank. Demonstration der Hämatoxylinwirkung.

Fig. 18. Oscillarien-Faden nach der Methylenblau-Bismarckbraun-Methode gefärbt. Demonstration analoger kernartiger Körner bei dieser Algenart. Vorkommen derselben in Gruppen.




Zeitschrift für Hygiene. Bd.V.
Taf.V.
Fig.1.
Fig.2.
Fig.3.
Fig.4.
Fig.5.
Fig.6.
Fig.7.
Fig.8.
Fig.9.
Fig.10.
Fig.11.
Fig.12.
Fig.13.
Fig.14.
Fig.15
Fig.16.
Fig.17.
Fig.18.
Fig.19.
Fig.20.
Veit & Comp


Fig.1.
Fig.2.
Fig.3.
Fig.4.
Fig.5.
Fig.6.
Fig.7.
Fig.8.
Fig.9.
Fig.10.
Fig.11.
Fig.12.
Fig.13.
Fig.14.
Fig.15.
Fig.16.
Fig.17.
Fig.18.
Veit & Comp.





